

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Biologie



Anna Piskáčková

Možnosti využití počítačové tomografie ve výzkumu obratlovců
The Potential of Computed Tomography in the Research of Vertebrates

Bakalářská práce

Školitel: RNDr. Petra Frýdlová, Ph.D.

Konzultant: doc. RNDr. Daniel Frynta, Ph.D.

Praha, 2016

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 19. 08. 2016

.....

Děkuji své školitelce RNDr. Petře Frýdlové, Ph.D. za odbornou pomoc, trpělivost a důvěru. Děkuji svým rodičům, kteří vytvořili bezpečné zázemí pro mé studium.

Abstrakt

Bakalářská práce shrnuje možnosti využití počítačové tomografie (CT) a především počítačové mikrotomografie (mikro-CT) ve výzkumu obratlovců. Práce sleduje použití této metody v zobrazování konkrétních struktur, podrobně mapuje doposud studované tkáně a dosažené rozlišení a hodnotí optimální využití mikro-CT. Cílem je navrhnout konkrétní oblasti, kde by bylo možné tuto progresivní metodu přinášející velmi detailní rozlišení struktur využít v kontextu morfologického, ekomorfologického a fylogenetického přístupu ke studiu obratlovců.

Počítačová tomografie se dnes uplatňuje nejen v lékařské a veterinární praxi, ale začíná být více využívána i při biologickém výzkumu zvířat. Výhodou počítačové tomografie je to, že je rychlá a do značné míry neinvazivní. CT a mikro-CT dnes dokáže zobrazit nejen mineralizované struktury, ale za použití kontrastních látek i měkké tkáně. Pomocí mikro-CT lze vytvořit přesné trojrozměrné obrazy malých struktur, což nám může pomoci například při studiu prostorově velmi složitých lebek a koster, a to i u velmi malých obratlovců. Práce se snaží nejdříve zmapovat princip CT a mikro-CT, jejich historii a možnosti za současného rozvoje techniky. Dále se zabývá využitím této technologie v konkrétních studiích. Snaží se získat přehled o zkoumaných strukturách a tkáních u jednotlivých druhů obratlovců a o výsledcích použité metody.

Klíčová slova:

počítačová tomografie, mikro-CT, obratlovci, trojrozměrné zobrazení, ekomorfologie

Abstract

This thesis explores and classifies the capacities of computed tomography (CT) and mainly microcomputed tomography (micro-CT) in vertebrate research. The thesis pursues the application of the method in imaging the particular structures, tries to gain a knowledge as wide as possible about the studied tissues of vertebrates and about the resolution achieved with micro-CT and evaluates the optimal employment of this method. The aim of this thesis is to propose particular structures ideal for employment of this progressive method with high resolution in morphological, ecomorphological and phylogenetical context of research in vertebrate zoology.

At present computed tomography is commonly used diagnostic method, which is employed not only in the medical and veterinary practice but also in biological research. The advantage of computed tomography is it's speed and the fact that it isn't invasive. CT and micro-CT can display mineralized tissues but also soft tissues with used of contrast agents. By micro-CT we create accurate three-dimensional projections of little structures. This can be helpful for example in research of spatially complex skulls and skeletons of even very small vertebrates. At first the thesis tries to map the principles of CT and mikro-CT, the history and the potential of the technique at present. Subsequently the thesis deals with the use of this technology in the research of vertebrates. It tries to get a summary of the examined species and the results of these experiments.

Keywords:

computed tomography, micro-CT, vertebrates, three-dimensional projection, ecomorphology

Obsah

Úvod.....	1
Počítačová tomografie.....	2
Vznik počítačové tomografie	2
Princip počítačové tomografie.....	5
Mikro-CT	8
Vznik a principy mikro-CT	8
Možnosti a výstupy mikro-CT	10
Využití mikro-CT ve výzkumu obratlovců	13
Vizualizace mineralizovaných tvrdých tkání.....	13
Vizualizace měkkých tkání za pomoci kontrastních látek.....	19
Malé a embryonální vzorky	19
Velké a postembryonální vzorky	23
Vizualizace měkkých tkání bez kontrastních látek	26
Návrh dalšího výzkumu obratlovců pomocí mikro-CT	28
Kosti a zuby	28
Hustota a struktura kostí.....	28
Smysly.....	29
Nervová soustava.....	29
Rohovité struktury	30
Cizorodá tělesa uvnitř zvířat	30
Svaly	30
Dýchací soustava	30
Závěr.....	31
Použitá literatura	32

Úvod

Počítačová tomografie (computed tomography – CT) je zobrazovací technologie založená na rentgenovém záření. Tato neinvazivní metoda umožňuje detailně zobrazovat jednotlivé struktury na povrchu i uvnitř těla živočichů a vytvářet jejich přesné trojrozměrné modely. Limitující je zatím dávka záření, kterou je nutno zvyšovat s požadavkem na vyšší rozlišení (Ritman, 2007).

CT je založené na detekci paprsku rentgenového záření oslabeného při průchodu tkání (Hounsfield, 1973). Dokáže proto bez problémů zobrazit především tvrdé tkáně – kosti a zuby. Za použití kontrastních látek je ale možné tuto metodu použít i pro vizualizaci měkkých tkání. Následné počítačové zpracování nasbímaných dat umožňuje rekonstruovat jednotlivé řezy a dnes už i vytvářet trojrozměrné modely tkání a orgánů. Spolu s rozlišením, které dnes dosahuje úrovně pod 1 μm (Attwood, 2006), se z podrobnějšího mikro-CT (micro-computed tomography – micro-CT) stává konkurent histologických metod schopný vizualizovat objekty buněčné a podbuněčné velikosti. Hlavní výhodou ovšem zůstává možnost vytvářet trojrozměrné modely tkání a orgánů. Spolu s možností přesného lineárního a objemového měření (Kawabe *et al.*, 2009) je tato metoda výhodná pro ekomorfologický výzkum, který se zabývá vlivem prostředí na morfologické změny živočichů (Losos, 1990). Cílem práce je proto shrnout, jaké konkrétní struktury a v jakém rozlišení lze pomocí mikro-CT zobrazit. Na základě rešerše se snažím nastínit další možnosti využití mikro-CT, a to především ve vztahu k ekomorfologii obratlovců.

Nejprve se v práci zabývám vznikem počítačové tomografie a vysvětlením jejího principu. Dále shrnuji současné možnosti CT spojené s technologickým rozvojem výpočetní techniky. Jedním z nových odvětví je právě mikro-CT využívané při skenování malých zvířat. V následující části se snažím postihnout široké možnosti využití mikro-CT napříč skupinou obratlovců a zmapovat metody a výsledky jednotlivých studií. Zároveň porovnávám také zobrazovací možnosti mikro-CT bez a s použitím kontrastních látek.

Na závěr navrhuji na základě získaného přehledu další využití mikro-CT ve výzkumu obratlovců.

Počítačová tomografie

Vznik počítačové tomografie

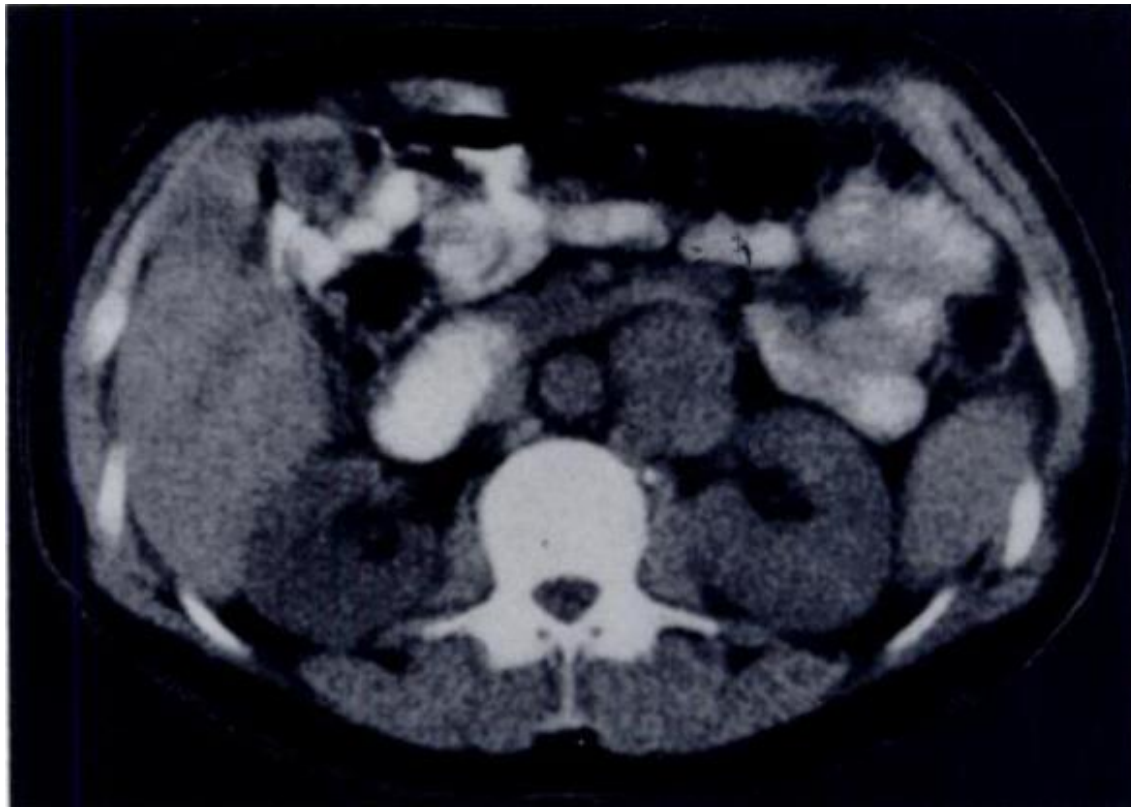
CT neboli počítačová tomografie („computed tomography“ nebo „X-ray computed tomography“) je metoda využívající rentgenové záření k získání informací o vnitřních strukturách prozařovaného vzorku. Metoda je neinvazivní, dovoluje tedy zkoumat i živé organismy a využívá se především v lékařství. Při ozařování živých organismů se ovšem musí kontrolovat dávka záření, což může být limitující pro kvalitu snímku. Vedle klasického rentgenu, který prozáří celý objekt najednou a vydá nám plošný (2D) snímek všech prozařovaných struktur, ale pokročilejší CT umožňuje získat trojrozměrné údaje o objektu (Cierniak, 2011; Hounsfield, 1973).

Myšlenkou na počítačovou tomografii se zabýval už Allan MacLeod Cormack, kterého napadlo při práci s rentgenem v roce 1956, že by bylo možné změřit pro každou tkáň v lidském těle její absorpci rentgenových paprsků, která závisí na hustotě dané tkáně. Cormack se rozhodl tyto informace matematicky zpracovat, vypočítat, z jakého bodu přesně pochází která naměřená hodnota absorpce, a vytvořit z těchto hodnot obraz snímaného objektu. Nejdřív vyzkoušel na uměle vytvořených vzorcích, zda jsou naměřené hodnoty absorpce pro danou látku konstantní, a po potvrzení této teorie sestrojil v roce 1963 tomograf, s nímž prováděl měření absorpce tkání. Převratné výsledky jeho pokusů byly publikovány už na přelomu let 1963 – 1964, ale doceněny byly až v 70. letech. V roce 1979 obdržel A. M. Cormack za svůj objev Nobelovu cenu společně s Godfrey Newbold Hounsfieldem. Ten nezávisle na Cormackovi pracoval na počítačové tomografii od roku 1967 a vyvinul tomograf, s nímž dokázal zpracovat snímané informace pomocí počítače (Cierniak, 2011; Cormack, 1980).

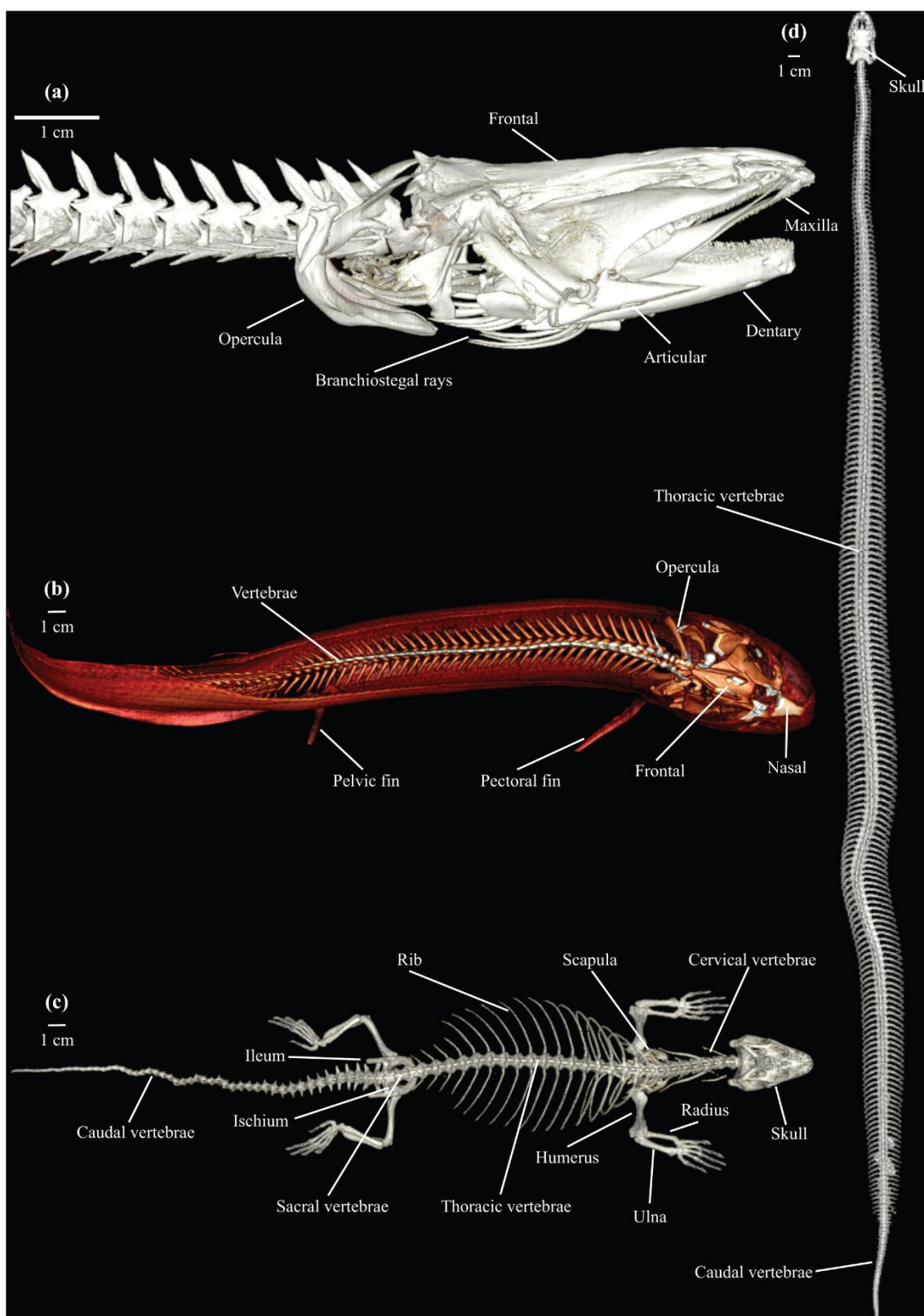
Hounsfield patentoval svůj přístroj („EMI-scanner“) už v roce 1968 a postupně ho vylepšoval. V roce 1973 dosáhl toho, že z počátečního několikahodinového snímání se stalo snímání několikasekundové a velmi se urychlila i zpočátku časově náročná rekonstrukce. Přístroj byl ale poprvé použit v lékařské praxi už v roce 1971 pro snímek mozku (Cierniak, 2011).

První získané snímky vnitřních struktur byly zachyceny na matici 80 * 80 bodů. Maticí se rozumí plošná mřížka tvořená těmito body, ve skutečnosti malými ploškami. Množství těchto plošek udává rozlišení obrazu podobně jako pixely a při vysokém

rozlišení je oko vnímá jako body, proto je tak dále budeme nazývat. U každého z bodů byla definována jeho absorpce rentgenových paprsků a jiný stupeň šedi (jednotlivé struktury jsou od sebe odlišitelné, pokud mají rozdílné hodnoty absorpce – tedy hustoty, což lze vylepšit i pomocí kontrastních látek). Matrice se postupně zjemňovala, i když sama metoda řešila zpočátku nedostatky s tím spojené. Čím byla matrice jemnější, tím bylo dosaženo lepšího ohraničení různých orgánů, ale jejich obraz byl znehodnocen silnějším zrněním. Pro lepší obraz vnitřní struktury orgánů proto bylo nutné volit řidší matrice, ale obraz byl kvůli tomu do jisté míry rozmazaný. Na snímcích také vznikaly artefakty kvůli nedokonalostem přístroje nebo pohybu snímaného objektu. Metoda se ale vyvíjela a už v 70. letech 20. století byl nalezen její potenciál pro vizualizaci krevního toku pomocí kontrastních látek. CT je totiž citlivá na přítomnost jódu a jiných těžkých prvků. K roku 2011 bylo v rozlišení obrazu dosaženo 2048*2048 pixelů a ohromné rychlosti rekonstrukce obrazu díky rozvoji počítačové techniky. Tomografy se také vyvíjejí a kromě spirálního CT vznikly přístroje, které umí snímat najednou ne řez v jedné rovině, ale ve 4, 8, 16, 64 nebo i 320 rovinách a využívají užšího rentgenového paprsku, což zde zlepšuje kvalitu obrazu i rychlost skenování (Cierniak, 2011; Ertl-Wagner *et al.*, 2008; Hounsfield, 1973; Hounsfield, 1976; Hounsfield, 1978).



Obr. 1. Řez lidským tělem v úrovni ledvin – ukázka kvality CT snímku ze 70. let (převzato z Hounsfield, 1978).

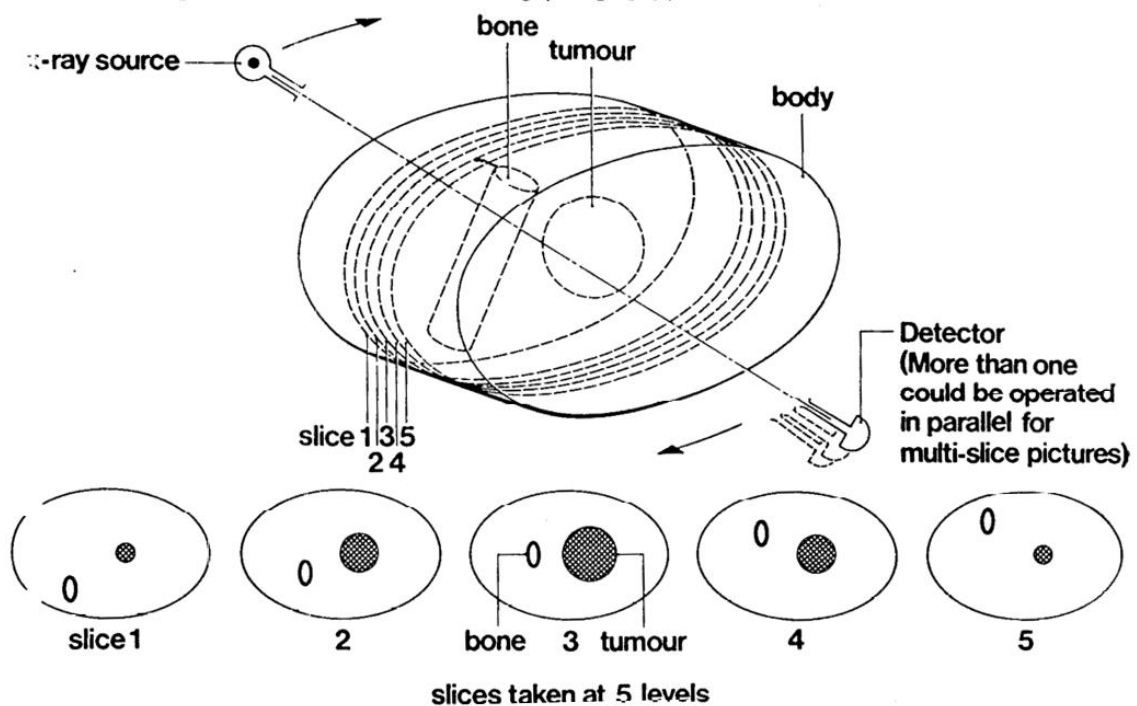


Obr. 2. 3D rekonstrukce koster a povrchu těla obratlovců pomocí mikro-CT – ukázka současných možností CT (převzato z Lauridsen *et al.*, 2011).

Kromě CT se rozvíjely v průběhu 20. stol. i další metody, např. PET (pozitronová emisní tomografie) a SPECT (jednofotonová emisní výpočetní tomografie), které umožňují analýzu zkoumaného objektu na molekulární úrovni. Tyto systémy jsou dnes spojovány do hybridních zařízení kombinující tyto techniky a profitující z obou. Navíc jsou dnes zkoumány i možnosti původního systému rekonstrukce obrazu – iterativní rekonstrukce („iterative reconstruction“), která byla později nahrazena filtrovanou zpětnou projekcí („filtered back projection“), jež umí odfiltrovat šum skeneru. Iterativní metoda s šumem statisticky počítá a umí rekonstruovat obraz lepší kvality při menší dávce radiace než filtrovaná zpětná projekce (Fleischmann & Boas, 2011). Tomografy snímající najednou více obrazů jsou dnes využívány běžně pro skenování srdce, které se špatně skenuje kvůli neustálému pohybu. Skener je přitom propojen s EKG a synchronizuje data z něj získaná s obrazem. Jsou vyvíjeny i tomografy se dvěma zdroji rentgenových paprsků („dual-energy CT“), které se liší svojí energií. Ty umožňují lepší odlišení materiálů s podobnou hustotou. Tento systém byl také vyvinut už Hounsfieldem a je popsán v jeho článku o popisu systému CT z roku 1973. Metoda CT se tedy stále vyvíjí a rozvětňuje v další metody, založenými na jejím principu, mezi něž patří i mikro-CT (Coleman *et al.*, 2005; Fleischmann & Boas, 2011; de Kemp *et al.*, 2010).

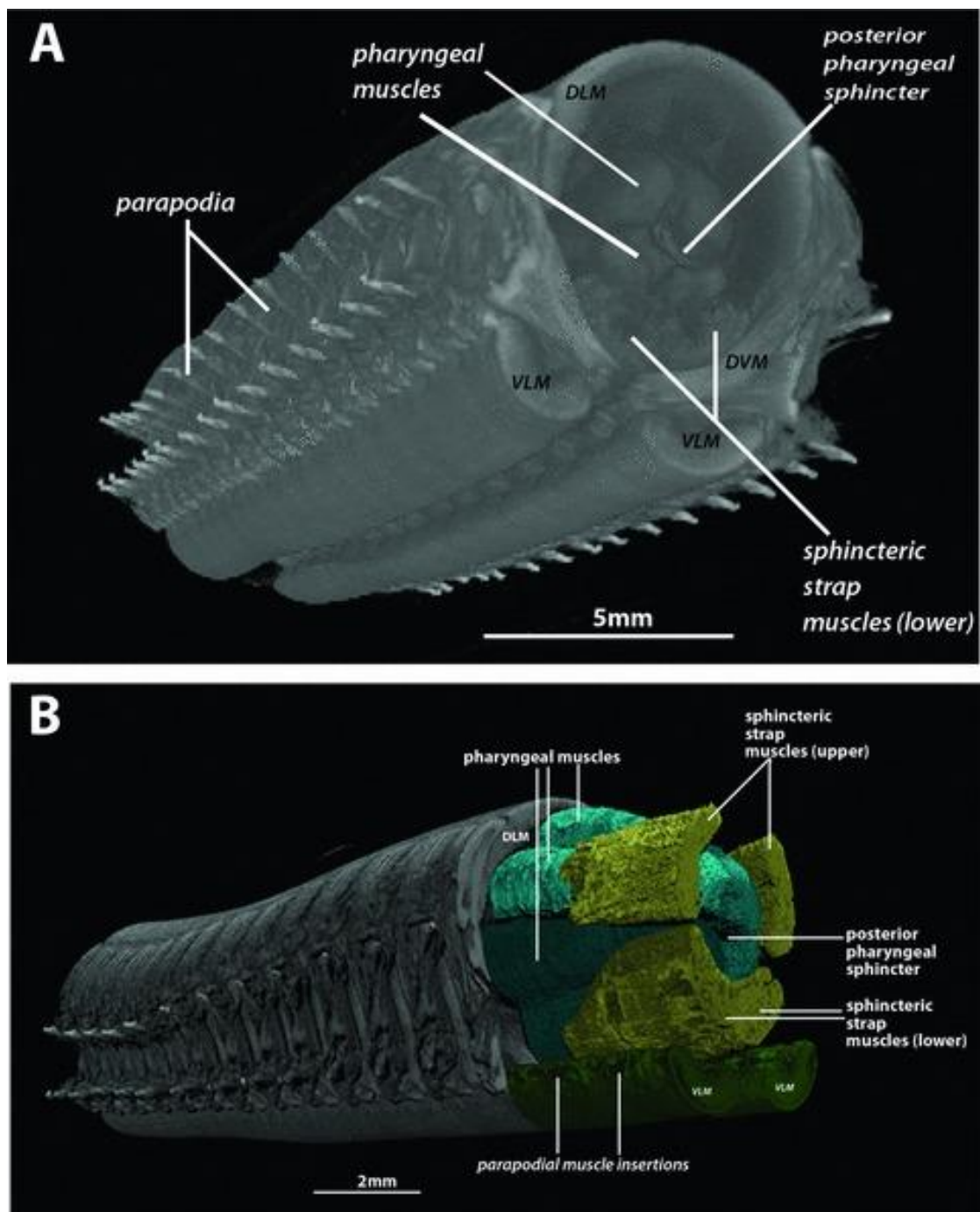
Princip počítačové tomografie

Během snímání pomocí počítačové tomografie je zkoumaný objekt prozařován rentgenovými paprsky vycházejícími z tzv. rentgenky („X-ray tube“). Rentgenové paprsky zde vznikají po urychlení elektronů ve vakuu vysokým napětím a jejich dopadu na anodu (Schambach *et al.*, 2010). Rentgenka je připojena na konstrukci umožňující rotaci kolem snímaného objektu, úhel rotace závisí na typu přístroje. Jsou využívány stroje s rotací např. 180°, 360°, ale i stroje se spirálovým pohybem kolem objektu („spiral CT“). Naproti rentgence je ke konstrukci připojen detektor, snímající dopadající zbytky rentgenového záření, které bylo oslabeno průletem přes skenovaný objekt, neboli měří absorpci. Podstavec, na němž je uložen snímaný objekt se po každém měření o kousek posune a postupně je nasnímán celý objekt. Výsledkem jsou po sobě jdoucí 2D řezy v definovaných paralelních rovinách, díky kterým máme představu o stavu vnitřních orgánů a především o jejich přesné poloze (Dudak *et al.*, 2015; Hounsfield, 1973; Lauridsen *et al.*, 2011).



Obr. 3. Hounsfieldův původní popis CT – zdroj rentgenového záření – „X-ray source“ a naproti němu detektor rotují kolem snímaného objektu. Ten je po každém snímání posunut o tloušťku řezu. Z nasnímaných dat jsou rekonstruovány řezy skládající trojrozměrný obraz vzorku (převzato z Hounsfield, 1973).

Nasnímané 2D řezy jsou poté složeny pomocí výpočetní techniky do 3D rekonstrukce objektu, sloužícího pro následné analýzy a tvorbu virtuálních řezů. K dispozici je volba vizualizace konkrétní struktury, např. jen kostry, libovolných vnitřních orgánů nebo vaskulární struktury – tzv. digitální pitva („digital dissection“) (Dinley *et al.*, 2010). Získaná informace může být uložena a uchována pro další výzkum, což je velmi výhodné například při použití CT pro výzkum mumií a v biologii nedocenitelné pro možnost nasnímání vzácných vzorků zvířat (Cosmacini & Piacentini, 2008; Dinley *et al.*, 2010).



Obr. 4. Ukázka digitální pitvy mnohoštětinatého červa *Nephtys hombergii*. Horní obr. představuje 3D rekonstrukci posteriorních hltanových segmentů. Na spodním obr. jsou po digitálním odstranění povrchu těla jasně patrné jednotlivé svaly kožně svalového vaku posteriorních hltanových segmentů (převzato z Dinley *et al.*, 2010).

Mikro-CT

Vznik a principy mikro-CT

CT se rozvíjí velmi rychle hlavně v oboru medicíny. Není divu, že mikro-CT se vyvinulo původně právě jako zobrazovací metoda laboratorních zvířat využívaných pro lékařský výzkum a pro sledování jejich zdravotního stavu (Bulantová *et al.*, 2016; de Crespigny *et al.*, 2008). Přístroje umožňující 3D rekonstrukci vnitřních orgánů a celého těla by se však mohly skvěle uplatnit i při biologickém, morfologickém a fylogenetickém výzkumu zvířat. Díky CT si můžeme vytvořit podrobný 3D model zkoumaného vzorku bez poškození anebo si vizualizovat jednotlivé orgánové struktury zvlášť (Lauridsen *et al.*, 2011).

Pro tělesnou velikost člověka dostačuje prostorové rozlišení 1 voxel = 1 mm³ (1 voxel je bezrozměrná prostorová jednotka, stejně jako pixel v ploše) a zvířata jeho velikosti mohou být zkoumána v podobném zařízení. Pro malá zvířata typu myši potřebujeme ale vyšší rozlišení než v mm³. Proto se od 80. let 20. stol. rozvíjí mikro-CT (Cosmacini & Piacentini, 2008; Ritman, 2004; Ritman, 2007).

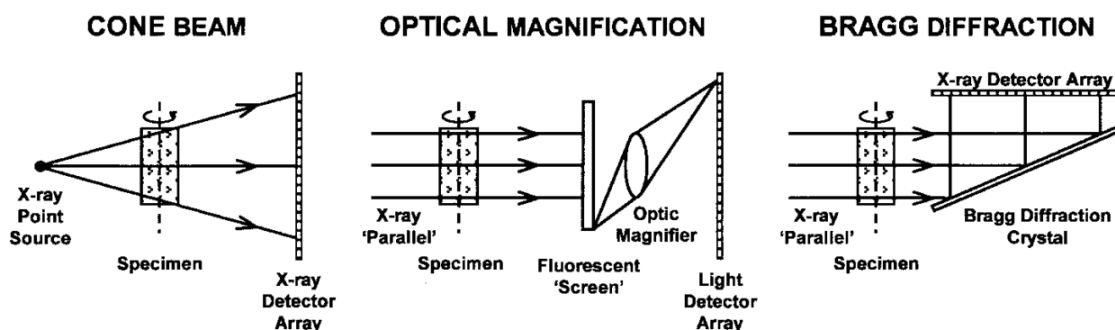
Protože se mikro-CT („microcomputed tomography“, „micro-CT“, „μ-CT“, „X-ray microtomography“, „high resolution CT“) používá pro zvětšení malých vzorků, jedná se většinou o malé stolní laboratorní tomografy („bench-top micro-CT scanners“). Podle typu konstrukce a schopnosti rozlišení se dělí mikro-CT do tří kategorií: mini-CT, mikro-CT a nano-CT (Ritman, 2011).

Mini-CT dosahuje rozlišení 200 – 50 μm na 1 voxel, které je vhodné pro skenování vnitřních struktur zvířat velikosti myši. Konstrukce mini-CT je zmenšeninou klinického přístroje, v němž rotuje skenovací zařízení, zatímco skenované zvíře leží nehybně. Typ konstrukce šetrný ke vzorku se hodí pro skenování živých zvířat. Navíc dávka záření nutná pro dané prostorové rozlišení ještě nezpůsobí okamžité poškození tkání, takže u zvířat lze sledovat například průběh nemoci, léčby a ozařovat je opakovaně. (Ritman, 2004; Ritman, 2007; Ritman, 2011). Zvětšení obrazu je zajištěno použitím vějířovitého rentgenového paprsku („fan beam X-ray source“), který dopadá na široký detektor. Snímá se buď klasicky řez za řezem anebo je CT spirální. Nevýhodou tohoto typu konstrukce je, že nelze upravit míru zvětšení, která je dána šířkou konstrukce nesoucí rentgenku a detektor. (Schambach *et al.*, 2010).

Mikro-CT dosahuje rozlišení 50 – 1 μm na 1 voxel, což postačuje pro skenování orgánů a jejich základních funkčních jednotek (nejmenších shluků různorodých buněk, které se chovají jako orgán, jenž je jimi tvořen) i buněk. Dávka záření potřebná pro rozlišení menší než 50 μm už ale vede k akutnímu poškození tkání a hodí se tedy pro skenování mrtvých zvířat (Ritman, 2004; Ritman, 2007; Ritman, 2011).

Nano-CT dosahuje prostorového rozlišení 1 - 0,1 μm a je vhodné pro skenování buněk a organel. Dávka záření pro takové rozlišení ale znamená pro živé tkáně takovou dávku radiace, že musí být tkáň fixována, aby se při snímání nerozpadla (Attwood, 2006; Ritman, 2004; Ritman, 2007; Ritman, 2011).

V přístrojích mikro a nano-CT jsou rentgenka a detektor umístěny staticky, zatímco vzorek rotuje kolem vertikální nebo horizontální osy. Pohyb vzorku může vést u živých nebo nezařezaných preparátů k poškození a artefaktům. Zvětšení je zajištěno buď přímo skenovacím paprskem ve tvaru kužele („cone beam CT“ anebo „volume-CT“), anebo optickou technikou umístěnou před dopadem paralelních rentgenových paprsků na detektor. Tyto přístroje umožňují nastavení zvětšení, ale bývají limitované velikostí snímaného vzorku. Také je s jejich pomocí možné získat klasické rentgenové 2D snímky. Výpočetní mechanismy pro rekonstrukci jejich obrazu jsou samozřejmě upraveny oproti klasické CT rekonstrukci z 2D řezů. (Schambach *et al.*, 2010).



Obr. 5. Principy mikro-CT – první obr. představuje rentgenového záření kuželového tvaru přímo zvětšující snímaný vzorek. Druhý a třetí obr. představují paralelní paprsky, jejichž použití samo o sobě objekt nezvětší. Zvětšení je dosaženo s pomocí optiky zařazené před dopadem rentgenových paprsků na detektor (převzato z Ritman, 2004).

Pokud chceme zachytit funkci dýchacího systému a srdce u živých zvířat, potřebujeme rychlé přístroje nejen s vysokým prostorovým rozlišením („spatial resolution“), ale i rozlišením časovým („temporal resolution“). U malých zvířat

s vysokou rychlostí metabolismu jsou nároky na přístroje tím vyšší a nejlépe jim vyhovují synchrotrony a pulzní zdroje („pulsed X-ray source“) (Ritman, 2004; Ritman, 2011). Pro takové snímání je potřeba využít tzv. „gating strategies“ nebo „gated scanning method“, které ve spojení s EKG nebo přímo s fyziologickými signály z orgánů dokážou vybrat data potřebná pro zobrazení nerozmazaného obrazu orgánu v určité fázi jeho cyklu (Schambach *et al.*, 2010).

Další vývoj mikro-CT bude nejspíš využívat právě synchrotronní zdroj („synchrotron X-ray source“). Ten dokáže vytvořit paprsek o velmi přesné energii a vlnové délce a byl použit například pro trojrozměrnou vizualizaci nefronů v ledvinách krysa s kontrastní látkou OsO₄ (Bentley *et al.*, 2007). Za použití synchrotronního zdroje a jeho monochromatického paprsku lze další metody zobrazování založit ne na klasickém sledování rozdílu intenzity paprsků dopadajících na vzorek a procházejících ven („attenuation-based X-ray imaging“), ale na vizualizaci konkrétních prvků nebo molekul i ve velmi malé koncentraci. Mezi takové metody patří „K-Edge Subtraction“, „X-Ray Phase Delay“, „X-Ray Scatter“, „X-Ray Fluorescence“ (Ritman, 2004).

Následující odstavce se ovšem věnují metodám mikro-CT založeným na klasickém sledování oslabení rentgenových paprsků při průchodu tkáněmi („attenuation-based micro-CT“).

Možnosti a výstupy mikro-CT

Nejlépe viditelné jsou na snímcích CT těžké struktury s atomy s vysokým protonovým číslem, které mají dostatek elektronů, s nimiž záření reaguje (Mizutani & Suzuki, 2012). Tradičně se tedy CT využívá pro vizualizaci kostí a jiných mineralizovaných struktur (Holdsworth & Thornton, 2002).

CT snímající absorpci rentgenových paprsků ve vzorku dokáže zobrazit především kontrast mezi strukturami, které se v absorbanci liší. Proto můžeme dobře vizualizovat povrchy zkoumaných vzorků, dýchací cesty a plíce, které jsou vyplněné řídkým vzduchem (Lauridsen *et al.*, 2011). Dobře viditelné jsou na snímcích tvrdé kalcifikované tkáně jako kostra nebo zuby a rozlišitelné bývají siluety orgánů. Tuk má menší absorbanci než proteiny (zobrazuje se na snímcích tmavší), proto může být dobře vystopován v okolí svalové tkáně (Pauwels *et al.*, 2013). S vizualizací měkkých tkání u obratlovců ovšem bývá problém. Pokud se na snímcích nacházejí tvrdé i měkké tkáně

dohromady, těžko se dosahuje viditelného kontrastu mezi měkkými tkáněmi (Lauridsen *et al.*, 2011; Mizutani & Suzuki, 2012; Pauwels *et al.*, 2013). Naproti tomu u bezobratlých lze dosáhnout dobrých výsledků bez kontrastních látek (Dinley *et al.*, 2010).

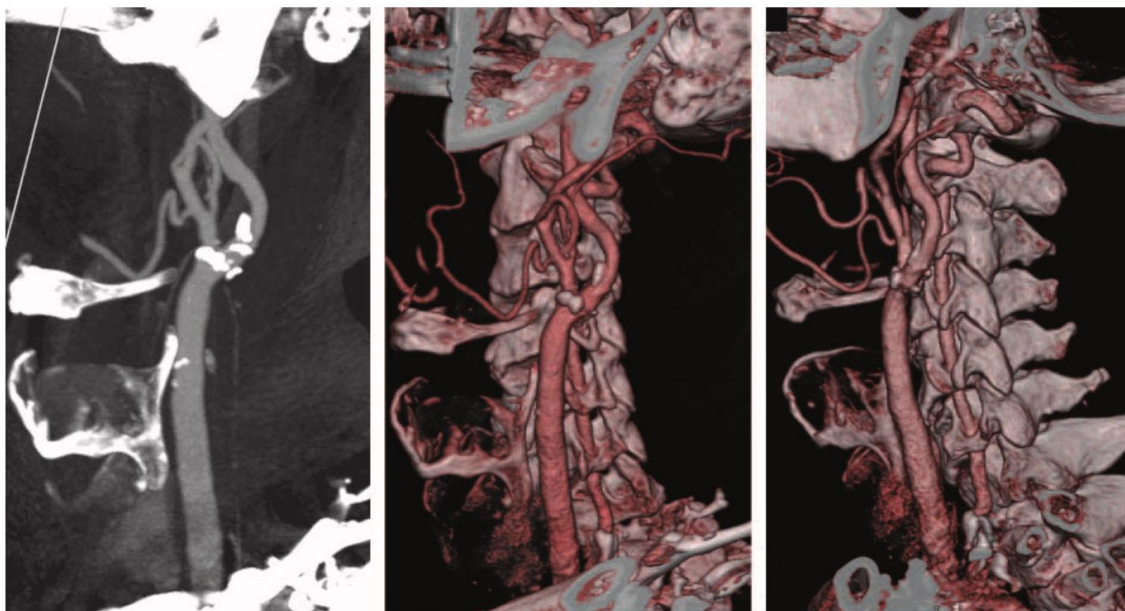
Pro vizualizaci struktury měkkých tkání obratlovců je potřeba použít kontrastní látky. Protože rentgenové paprsky nejlépe zobrazují těžké atomy, jsou pro kontrastní látky používány sondy s těžkými prvky jako například osmium, molybden, wolfram, platina, olovo, stříbro, zlato a jód (Descamps *et al.*, 2014; Mizutani & Suzuki, 2012). Jódové kontrastní látky se používají pro vizualizaci krevního řečiště, trávicí soustavy, močových cest a prokrvených struktur v lékařství, ale jsou hojně využívány i při skenování zvířat (de Crespigny *et al.*, 2008; Mizutani & Suzuki, 2012; Metscher, 2009a; Metscher, 2009b). Pro skenování v mikroměřítku za použití jódových kontrastních látek se proto vžil název „iodine-enhanced μ -CT“, zatímco pokud chceme zdůraznit opak, můžeme naši metodu pojmenovat jako „non-enhanced μ -CT“. Pro účely mikro-CT (jímž skenujeme neživé vzorky) se celý vzorek ponoří do vodného nebo alkoholového roztoku s kontrastní látkou a nechá se jí napustit (de Crespigny *et al.*, 2008; Descamps *et al.*, 2014; Lauridsen *et al.*, 2011; Metscher, 2009a; Metscher, 2009b; Mizutani & Suzuki, 2012). Možnost používat kontrastní látky v alkoholovém roztoku je velmi výhodná při skenování muzejních vzorků (Metscher, 2009b). Další možností je napustit kontrastní látku přímo do cév zvířete, což může být použito k vizualizaci cév a prokrvených orgánů (Bentley *et al.*, 2007; Holdsworth & Thornton, 2002).

Při produkci rentgenového záření vzniká záření různých vlnových délek od 10^{-12} do 10^{-8} m (Reichl & Všeticka, 2016), tedy od 1 pm do 10 nm, které odpovídá různým energiím fotonů. Čím větší vlnová délka, tím menší energie. Slabší rentgenové paprsky „měkké“ jsou absorbovány ve vzorku a silnější „tvrdé“ jím procházejí (proto jsou také pro vizualizaci měkkých tkání vhodnější „měkké“ paprsky, jichž je dosaženo při menším urychlovacím napětí). Díky tomu je možné měřit absorpci struktur a vytvořit CT snímek (Attwood, 2006; Mizutani & Suzuki, 2012).

Závisí na typu konstrukce mikro-CT, zda získáme paralelní řezy vzorkem anebo rovnou obraz celého vzorku (Schambach *et al.*, 2010). Dříve se při tradičním paralelním snímání vyhodnocovaly jednotlivé řezy. Dnes jsou ovšem po snímání údaje z každého voxelu složeny do 3D modelu, z něhož můžeme pomocí počítače generovat řezy libovolnými rovinami nebo izolovat jednotlivé struktury a odlišit je přidanou barvou (Dinley *et al.*, 2010).

Pro tvorbu takového 3D modelu slouží metoda prostorového renderování („volume rendering“), která umožňuje zobrazit vnitřní struktury s přiřazenou barvou, čímž zjednodušuje čtení obrazu. Struktury také mohou být zobrazeny průhledně a umožnit zhlédnutí jejich vnitřních návazností. Právě s touto technikou vznikají nejefektivnější prostorové obrazy micro-CT, které dovolují pozorovat přesné zvětšené modely malých struktur (Descamps *et al.*, 2014). CT může být díky tomu použita například pro výzkum vzácných muzejních exemplářů anebo ohrožených druhů (Dinley *et al.*, 2010) a má velký potenciál především pro svou schopnost zobrazit složité prostorové struktury a návaznosti, což bylo například využito pro studium nervových spojů v mozkové kůře (Mizutani & Suzuki, 2012).

Využívána je ale i jiná metoda zpracování dat: projekce maximální intenzity („maximum intensity projection“ – „MIP“), která dovoluje na 2D snímku jasně zobrazit struktury s nejvyšším kontrastem. Výstup je sice podobný klasickému rentgenu, zde ale může virtuálními řezy vybírat, jaký úsek těla bude na snímku zobrazen. Tato technika dokáže především zobrazit cévní řečiště a používá se v angiografii (Descamps *et al.*, 2014; Fishman *et al.*, 2006).

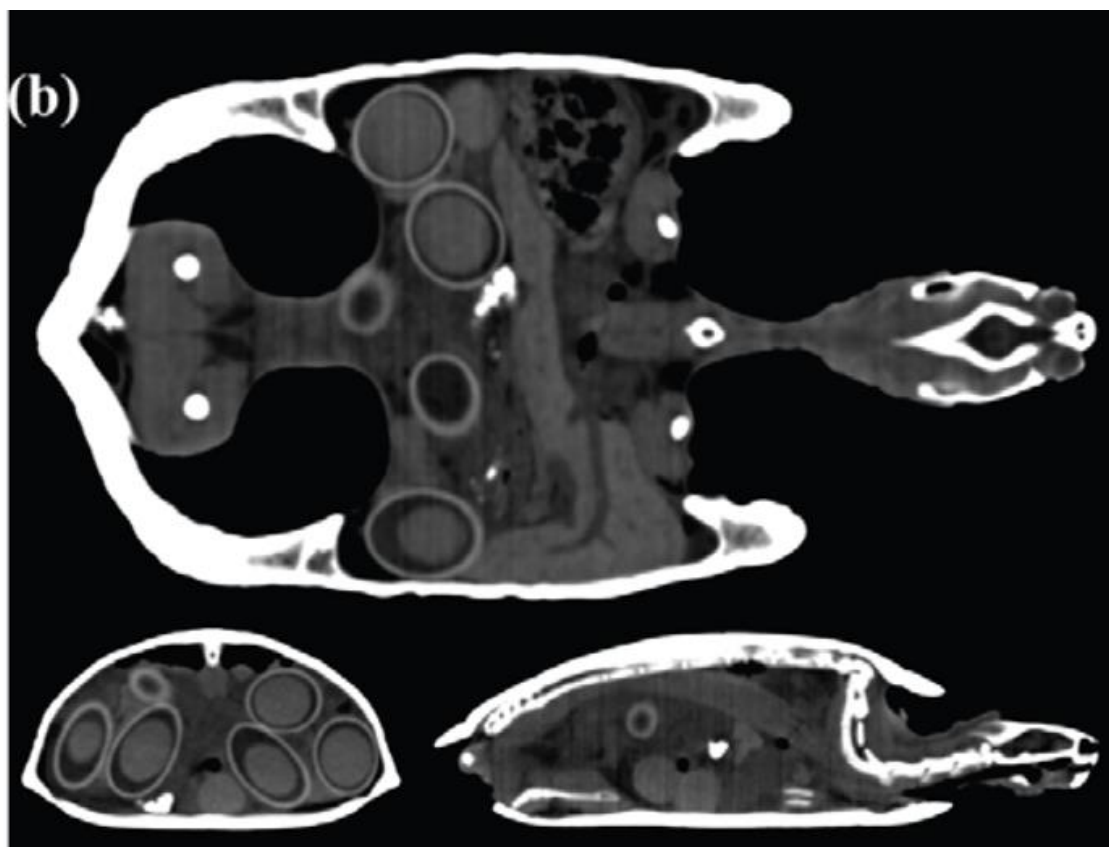


Obr. 6. Porovnání obrazu projekce maximální intenzity a obrazů prostorového renderování – první obr. představuje projekci maximální intenzity, druhý obr. ukazuje prostorový render se zprůhledněním některých kostí, třetí obr. je prostorový render s neprůhlednými kostmi a cévami (převzato z Fishman *et al.*, 2006).

Využití mikro-CT ve výzkumu obratlovců

Vizualizace mineralizovaných tvrdých tkání

Jak už bylo řečeno, CT a mikro-CT má velký potenciál pro trojrozměrné zobrazování tvrdých tkání. Dokládá to například Lauridsenova studie, která předložila snímky jednotlivých zástupců obratlovců a předvedla široké možnosti CT. Mikro-CT zde bylo použito pro skenování zástupců ryb, obojživelníků, plazů a savců v rozlišení 64 μm na voxel. Kostry byly zobrazeny u želvy nádherné (*Trachemys scripta*), hrdložábříka bílého (*Monopterus albus*), bahníka západoafrického (*Protopterus annectens*), varana stepního (*Varanus exanthematicus*) a krajty královské (*Python regius*). Kromě toho byla kostra vizualizována i u dalších druhů spolu s oběhovou soustavou a vnitřními orgány už za použití kontrastních látek. Bez kontrastní látky se podařilo zachytit ještě nenakladená vajíčka uvnitř želvy (Lauridsen *et al.*, 2011).

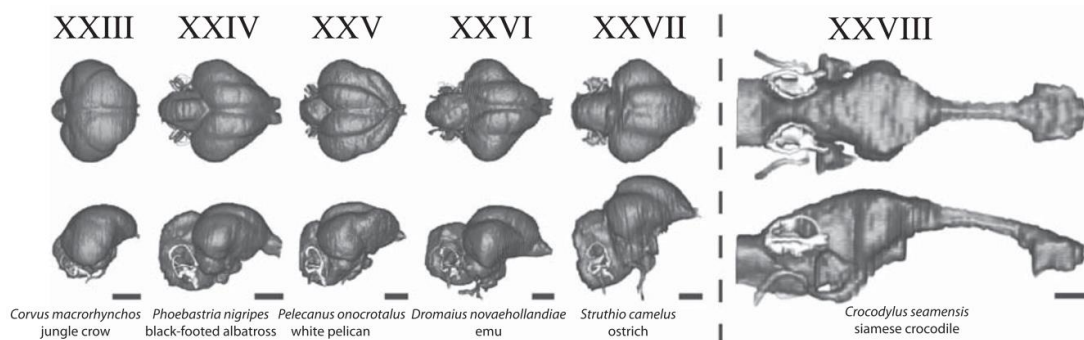


Obr. 7. Virtuální řezy tělem želvy nádherné s viditelnými ještě nenakladenými vajíčky (převzato z Lauridsen *et al.*, 2011).

Prostorově nejsložitější strukturou tvořenou kostní tkání je samozřejmě lebka. CT je pro její studium ideální, protože prostorově přesně zobrazuje složitý tvar lebky, tloušťku jednotlivých kostí, která by se nedala zjistit bez narušení vzorku, a dokáže přesně rekonstruovat vnitřní prostory lebky. 3D projekce získané s mikro-CT (rozlišení nebylo uvedeno) byly využity například pro výzkum hatérie novozélandské (*Sphenodon punctatus*). Trojrozměrný model lebky se pomocí dalšího softwaru opatřil čelistními svaly. Díky modelu byla vypočítána síla stisku hatérie, která se ovšem liší od experimentálně získaných dat – je zhruba třikrát nižší než skutečný stisk. Odlišnost teoretického odhadu a reality je pravděpodobně způsobena zpeřením svalu. Autoři poukazují na potřebu porovnávání dat vypočítaných pomocí zde použité metody fyziologického průřezu svalovým vláknem („physiological cross-sectional area“ – „PSCA“) a skutečných dat. Právě model lebky získaný pomocí CT zde však posloužil jako přesný základ pro další výzkum (Curtis *et al.*, 2010). Ve studii ještě nebyly použity kontrastní látky, které dnes mohou výzkum svalů, jejich dynamiky a síly velmi ulehčit (viz dále). CT projekce lebky se za využití nejnovějšího softwaru používají podobně i pro rekonstrukce a výzkum vymřelých obratlovců. Trojrozměrný model lebky dinosaura *Allosaurus fragilis*, který se podařilo pomocí CT vytvořit na základě fosilních nálezů, pomohl vysvětlit pravděpodobné strategie lovu a krmení tohoto dinosaura. Podle analýzy tlaku, kterou bylo možné provést díky CT projekci (zde se ovšem nepoužívalo mikro-CT, jednotlivé CT řezy byly od sebe vzdáleny 4 mm), se předpokládá, že stisk Allosaura nedokázal drtit kosti, ale zato lehká a pevná lebka odolávala nárazům, ke kterým mohlo docházet při rychlém lovu (Rayfield *et al.*, 2001).

K výzkumu fosilií vymřelých druhů a k fylogenetickým studiím může CT přispět i jiným způsobem. Na základě rekonstrukce vnitřních prostor lebky díky mikro-CT tzv. metody „virtuálního odlitku“ („endocast“) byly změřeny objemy mozků 27 žijících druhů ptáků z 12 řádů při rozlišení 48 – 480 μm (Kawabe *et al.*, 2009). Následně se měřila délka, šířka a výška mozků. Bylo zjištěno, že právě mezi šířkou mozku a jeho celkovým objemem je u ptáků lineární závislost. Ta se ovšem nepotvrdila pro výšku a délku mozku. Výsledky byly rozšířeny o výzkum fosilních nálezů, z nichž lze právě šířku mozku změřit nejčastěji díky zachování silných spánkových kostí. Změřené šířky mozků a vypočítané objemy u 8 vymřelých druhů ptáků odpovídaly i odhadům jiných studií. Neodpovídal jedině odhad objemu mozku u Archeopteryxe (*Archaeopteryx lithographica*). Tuto nesrovnalost autoři studie připisují ještě spíše ještěří podobě Archeopteryxova mozku, který je na rozdíl od ptačího užší, a odhad podle šířky ve srovnání s ptáky zde není možný.

Užší a delší mozek byl totiž změřen i u současného zástupce krokodýlů - krokodýla siamského (*Crocodylus siamensis*). Autoři upozorňují, že podobné studie za pomoci CT, které umožňují výzkum vyhynulých druhů díky porovnání s žijícími živočichy, mohou být hodnotné i pro další skupiny živočichů (Kawabe *et al.*, 2009).



Obr. 8. Porovnání tvarů mozků ptáků s mozkem krokodýla získaných jako virtuální odlitek vnitřního prostoru lebky – obr. 27 ptačích mozků je uspořádáno podle objemu od nejmenšího po největší 27. mozek (zde je vybrána pouze poslední řada). 28. mozek patří krokodýlovi (převzato z Kawabe *et al.*, 2009).

Metoda „virtuálních odlitků“ získaných pomocí CT byla použita i pro změření prostor vnitřního ucha u zástupců ptáků a plazů. Soubor 59 druhů tvořila zvířata, o nichž je známo, že mají vyvinutou vokalizaci. Měřil se objem místa, které je vymezeno pro hlemýžď uvnitř skalní kosti. Studie udává, že na velikosti hlemýžďe závisí rozměry bazální papily – orgánu se sluchovými receptory u ptáků a plazů. Dosažené zvětšení pro mikro-CT není uvedeno. Naměřené míry byly poměřeny s délkou lebek a upraveny tak, aby celková velikost zvířat neovlivnila výsledky. Bylo prokázáno, že zvířata, u nichž je znám lepší sluch, tedy že slyší zvuky většího rozsahu frekvencí, mají delší bazální papilu. Také bylo prokázáno, že zvířata s delší bazální papilou, a tedy s citlivějším sluchem mají komplexnější vokalizaci a žijí v sociálních skupinách. Autoři tedy propojují morfologickou studii s odhadem ekologie a etologie zkoumaného druhu. V případě dostatečně zachovalých vzorků by ze získaných údajů bylo možné odvodit citlivost sluchu a potenciálně i sociální chování již vyhynulých druhů (Walsh *et al.*, 2009).

Potenciál morfologických studií lebky za pomoci mikro-CT se ukázal při výzkumu utváření sekundárního tvrdého patra a Jacobsonova orgánu u šupinatých plazů. Stupeň uzavření sekundárního tvrdého patra závisí na míře srůstu kostí maxilla, vomer a palatine. Ten je nejméně přítomen u hatérií a leguánů, ale začíná být přítomen u gekonů

a ještěrek skupiny *Autarchoglossa*. Skenování byli zástupci téměř 150 druhů uchovávaní v lihu. Dosažené zvětšení se pro každý vzorek lišilo a v textu není uvedeno (Rieppel *et al.*, 2008). Výsledky studie a názor na fylogenetický vývoj plazů odhadovaný podle stupně utvoření sekundárního patra se shoduje i s názorem studií založených na sledování potravních strategií šupinatých plazů. Ty považují také za bazální skupiny plazů hatérie a leguány, kteří mají vyvinutý vychlípitelný jazyk, použitelný k manipulaci s potravou. Jacobsonův orgán se formuje poprvé až u *Scleroglossa* spolu s přizpůsobením a redukováním jazyka podílejícího se už ne na lovu, ale na chemorepci. Výsledky výzkumu (Rieppel *et al.*, 2008) se neshodují s fylogenetickými studiemi založenými na sekvenaci jaderných a mitochondriálních genů (Pyron *et al.*, 2013), které mají zcela jiný názor na fylogenezi a bazální skupiny šupinatých plazů (Squamata).

Jako velmi hodnotné se jeví CT při sledování center osifikace a růstu kostí v ontogenetickém vývoji. Mikro-CT například přispělo k výzkumu utváření lebky v embryonálním vývoji vejcorodé krajty písmenkové (*Python sebae*). Skenována byla embryo ve dvou stádiích vývoje – ve 33 dnech po kladení snůšky s rozlišením 1 voxel = 5 μm a v 75 dnech od nakladení vajec (téměř před vyklubáním) s rozlišením 1 voxel = 25 μm . Pomocí mikro-CT byla zobrazena desmogenní osifikační centra lebky a porovnána s již téměř vyvinutou lebkou s vyvinutými klouby a srostlými švy. Studie prokázala, že tvary lebečních kostí se prokazatelně formují dříve, než by mohly být ovlivněny působením svalů. Svaly se ovšem později mohou podepsat na mohutnosti kostí (Boughner *et al.*, 2007).

Podobná studie sledovala centra osifikace lebky u varana žlutoskvrnného (*Varanus panoptes*). Byla při ní vytvořena vývojová řada z 15 vzorků varaních embryí o stáří v rozmezí od 9 do 186 dnů. Vzorky byly skenovány v rozlišení od 36 do 74 μm . Během studia byla přesně zmapována doba vzniku každé lebeční kosti. Ukázalo se, že jako první se začínají formovat kosti s desmogenní osifikací a až následně kosti s osifikací chondrogenní. Autoři následně porovnávali postupy vzniku lebečních kostí u skupin příbuzných varanů a upozornili na možnost přispění této metody k fylogenetickým studiím (Werneburg *et al.*, 2015).

Mikro-CT má potenciál při funkčně anatomických a morfologických studiích, jak dokazuje jeho použití při výzkumu mořských želv. U dvou želv – karety obecné (*Caretta caretta*) a karety menší (*Lepidochelys kempii*) byla objevena podobnost ve tvaru lebky a uchycení žvýkacích svalů. Mohutné svaly jsou lebkou zakryté. Tyto želvy mají na rozdíl od příbuzných krátký krk a malý jazyk a nemohou nasátím vody vyvinout dostatečný

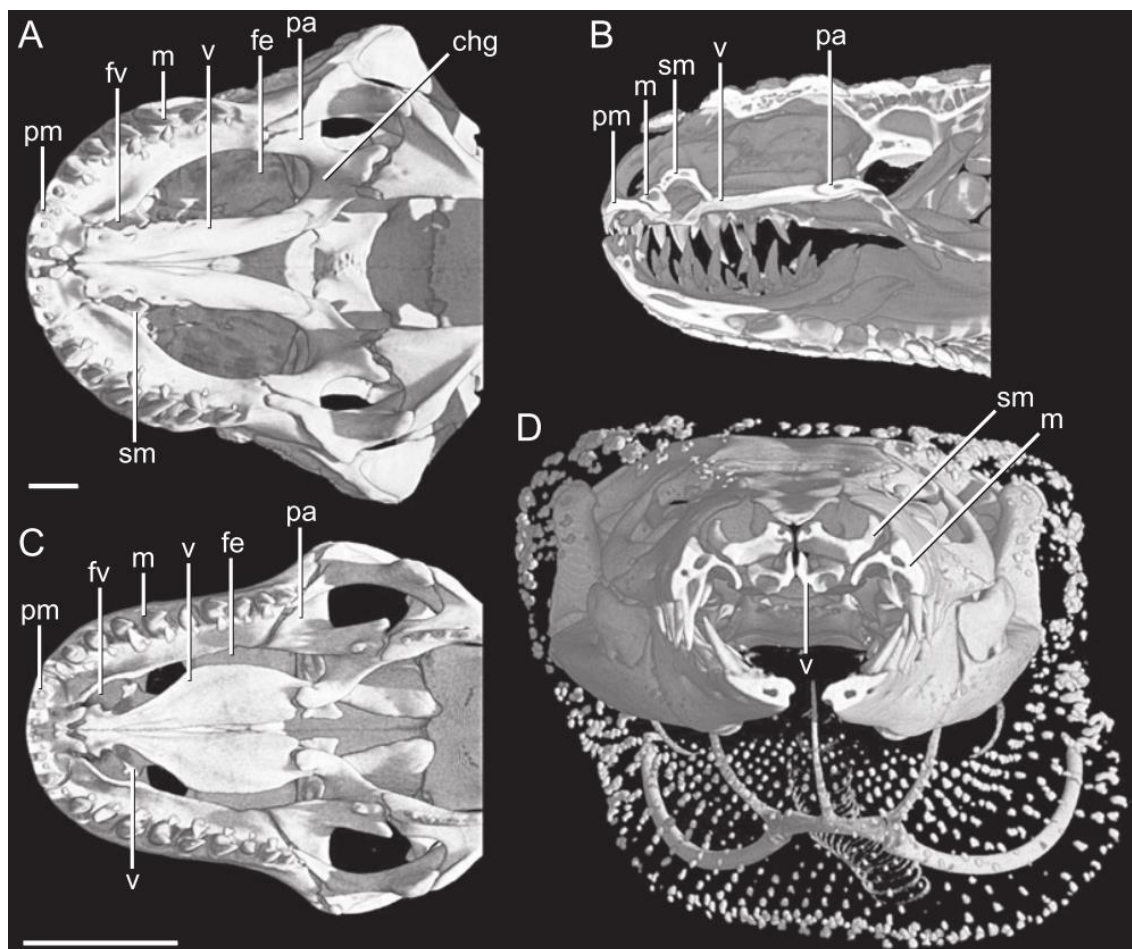
podtlak, který pomáhá při lovení kořisti. Žvýkáci svaly obou želv jsou ale velmi silné. Slouží k uchycení vysokého tvaru lebky a jsou napjaté přes *squamosum* (kost skalní) a *quadratojugale*, čímž vytváří silnou páku při skusu. Výsledky studie jsou v souladu se zjištěnými potravními strategiemi obou želv, které se živí pomalými obrněnými tvory a potřebují rozdrtit jejich schránku. Díky mikro-CT zde byly rekonstruovány 3D obrazy želvích lebek. U karety menší se dokonce podařilo nasnímat i samotné žvýkáci svaly, a to bez použití kontrastních látek. Dosaženo bylo prostorového rozlišení 0,121 mm a 0,081 mm (Jones *et al.*, 2012).

Kromě lebky, která je asi z fylogenetického a ekomorfologického hlediska u obratlovců nejzajímavější, byly pomocí CT sledovány i další mineralizované struktury. Centra osifikace i její postup byly pomocí mikro-CT pozorovány pro objasnění růstu stehenní kosti u myší. Po narození u savců probíhá osifikace dlouhých kostí typicky od střední části kosti – diafýzy – tak, že do kosti vnikají cévy a zdejší původně krví nevyživovaná chrupavka je nahrazena kostní tkání. Pro další růst do délky se formují na proximálním i distálním konci sekundární osifikační centra oddělená od diafýzy růstovou chrupavkou. Když kost naroste do odpovídající velikosti, epifýza i diafýza srostou a zaniká růstová chrupavka. U myší se předpokládal jiný postup, že se totiž neformuje sekundární osifikační centrum, ale stehenní kost roste a osifikuje z primárního osifikačního centra diafýzy. Studie však prokázala, že u myší nastávají obě popsané situace. Sekundární osifikační centrum se sice formuje, ale jen na distálním konci femuru. Obrazy z mikro-CT (rozlišení 1 voxel = 12 μm) byly porovnávány s radiografií a histologií a lze z nich jasně vyčíst pozorovaný vývoj vnitřní struktury a tvaru kosti. Na proximální části femuru zobrazilo CT mineralizující chrupavku, z níž se formuje kost a nejasně i cévy uvnitř kosti. Jinak zobrazilo mikro-CT pouze kost a chrupavka se dala vytušit jen z prázdného místa mezi osifikačními centry (Cole *et al.*, 2013).

Pomocí mikro-CT lze zkoumat nejen vnější povrch kostí, ale i jejich vnitřní strukturu. Ze snímků trabekulární kosti femuru 91 obratlovců od velikosti rejska po slona při zvětšení 3,4 – 15 μm na voxel bylo vypořováváno, že se zvětšující se hmotností nevzrůstá objem kostní tkáně ve vzorcích. Mění se však vnitřní struktura kosti. Trabekulární kost u těžších zvířat formuje tlustší síť s většími mezerami a méně propojeními, což pravděpodobně umožňuje přenášet větší tlaky uvnitř kosti (Doubé *et al.*, 2011).

Kromě kostí a mineralizované chrupavky byl potenciál mikro-CT ověřen i při zobrazení zubů. Zuby byly jasně zobrazeny například v již zmíněné Rieppelově studii,

kteřá se zabývala různými podobami Jacobsonova orgánu (Rieppel *et al.*, 2008). S rozlišením 0,081 mm na voxel se metoda dokonce ukázala jako dostatečně přesná k výzkumu pro klinickou praxi u lidí. Kromě věrných 3D rekonstrukcí zubů a jejich povrchu se podařilo zobrazit i přesný průběh kořenových kanálků (Rhodes *et al.*, 1999).



Obr. 9. Detailní zobrazení lebek se zuby u korovce mexického (*Heloderma horridum*) a varanovce bornejského (*Lanthanotus borneensis*). A – lebka korovce - ventrální pohled na lebku bez spodní čelisti. B – lebka korovce – podélný řez. C – lebka varanovce - ventrální pohled na lebku bez spodní čelisti. D – lebka varanovce – příčný řez kostmi tvořícími sekundární tvrdé patro. U varanovce zobrazeny i rohovité kýlnaté šupiny (převzato z Rieppel *et al.*, 2008).

Vizualizace měkkých tkání za pomoci kontrastních látek

Malé a embryonální vzorky

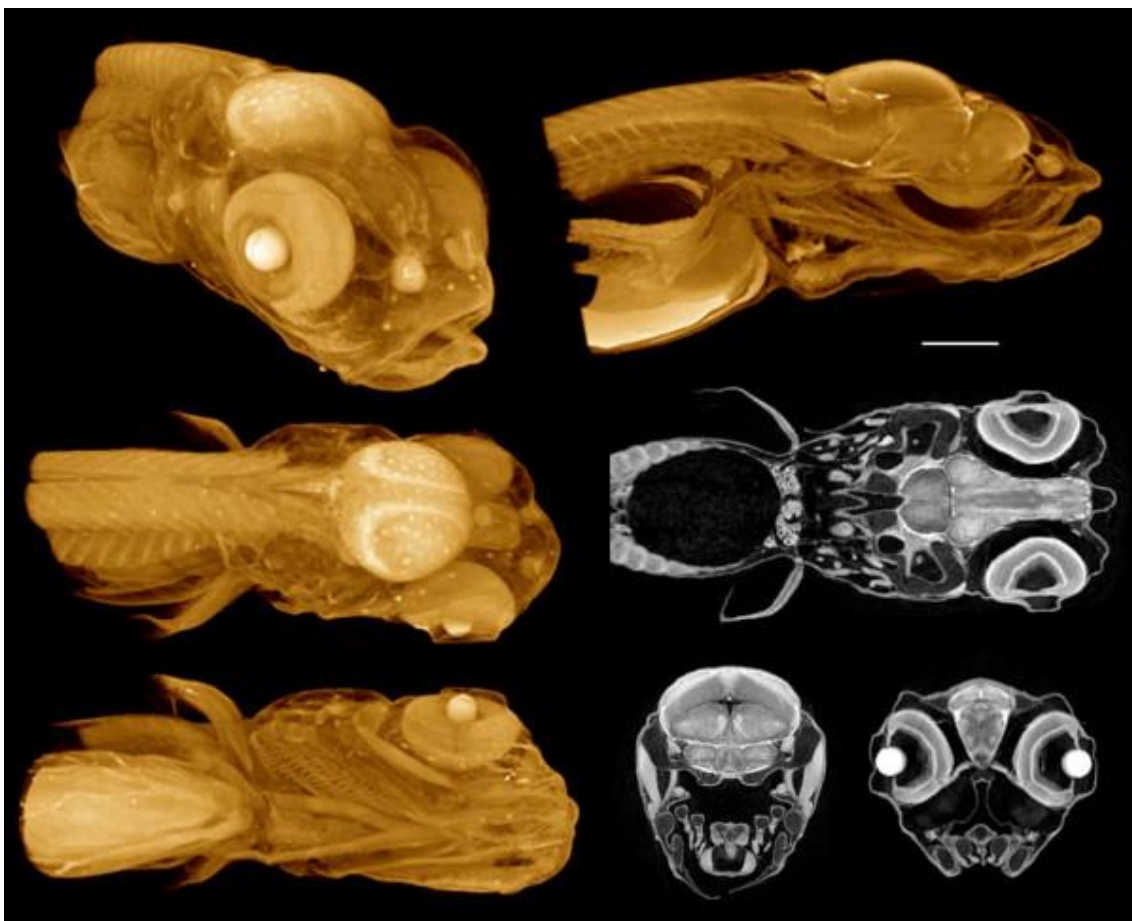
Aby mohla být kontrastní látka s úspěchem použita pro mikro-CT, musí dobře pronikat do vzorku, který do ní bývá celý ponořen. Musí také vytvořit co nejlepší kontrast mezi tkáněmi a nesmí vzorek poškodit. Příliš koncentrovaná kyselina nebo roztok kontrastního činidla může ve vzorku způsobit artefakty ve formě sraženin (Pauwels *et al.*, 2013). Pro následné zachování vzorku je výhodné, pokud se z něj látka nevyplaví například při máčení ve vodě (mezi takové látky patří HgCl_2 , PTA, PMA (kyselina fosfomolybdenová) a $(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4$) (Pauwels *et al.*, 2013). Doba, za jakou kontrastní látka pronikne vzorkem, je dána její rychlostí penetrace („penetration rate“) a velikostí vzorku. U malých vzorků (např. myši embrya) není s penetrací takový problém. Ten už ale může nastat, pokud chceme pomocí CT zobrazit vzorek větších rozměrů. Rychlost pronikání kontrastní látky do vzorku může ovlivnit její koncentrace, rozpouštědlo, složení tkání, ale i předchozí nakládání se vzorkem (například použité fixační činidlo) (Pauwels *et al.*, 2013). Tato kapitola se zabývá metodami zobrazení malých a embryonálních vzorků.

Pro vizualizaci měkkých struktur jsou s velkým úspěchem používány kontrastní látky. Zatím jsou ovšem hledány optimální způsoby jejich využití ve spojení s tak mladou technikou, jakou je mikro-CT. Potenciál použití kontrastních látek pro vizualizaci měkkých struktur pomocí mikro-CT u zvířat byl ukázán teprve nedávno. Například Johnson a jeho kolegové (2006) vyzdvihují možnosti mikro-CT pro sledování vývoje myších embryí, u nichž byly pozměněny geny („gene targeting“). Různě stará embrya byla ponořena do kontrastního činidla (OsO_4) a skenována při zvětšeních 8 μm a 27 μm na voxel. U embryí byly v obou rozlišeních vizualizovány kromě povrchu vzorku i vznikající části mozku, neurální trubice, srdeční komory a játra (Johnson *et al.*, 2006).

Metoda byla použita ve svých počátcích i pro vizualizaci králičích a krysích mozků. Na králičích mozcích se vybírala nejúčinnější kontrastní látka. Z pěti odzkoušených látek byl vybrán Hypaque (jodová kontrastní látka), který byl použit pro vizualizaci nádoru uvnitř krysího mozku. Kromě nádoru byla na tkáni s rozlišením 16 μm jasně rozeznatelná i bílá a šedá hmota mozková, což se pravděpodobně za použití mikro-CT u zvířat podařilo vůbec poprvé (de Crespigny *et al.*, 2008).

V následující studii se pro zobrazení měkkých tkání kuřecích embryí osvědčil Lugolův roztok a PTA (kyselina fosfowolframová). S těmito látkami se manipuluje snadněji než s toxickým a těkavým oxidem osmičelým (OsO_4). Kuřecí embrya byla skenována v různých stádiích vývoje s rozlišením od 3,5 do 9,5 μm a byly u nich pozorovány struktury vyvíjející se cévní soustavy (srdeční klička, krev), smysly (sluchové váčky, oči), nervové soustavy (základ mozku, hlavové nervy, spinální nervy a ganglia), pupeny zadních končetin a zárodek ledvin. Patrné byly i buňky neurální lišty a vývoj nervové trubice. Jasnější kontrast je docílen u více diferencovaných tkání starších embryí (Metscher, 2009a).

Experimenty s PTA a anorganickými sloučeninami jódu byly rozšířeny i na další organismy, bezobratlé (měkkýše, hmyz i hlavonožce) i obratlovce – zástupce ryb, obojživelníků i savců (Metscher, 2009b). Každá z použitých látek se lépe hodí pro jiné organismy a jiné fixační látky. PTA, která se váže na kolagen a jiné proteiny a dobře zobrazuje svalovou tkáň, se osvědčila při zobrazování ryb a obojživelníků. PTA i sloučeniny jódu dobře zobrazují také nervové tkáně a rozdílné části mozku. U ryb veslonosa amerického (*Polyodon spathula*) a lipana podhorního (*Thymallus thymallus*) ukázala PTA receptory postranní čáry, nosní dutiny a svaly, optické nervy a vrstvy sítnice v oku, dále chrupavčitou lebku, odlišné části mozkové tkáně a čichové orgány. U axolotla mexického (*Ambystoma mexicanum*) se s PTA podařilo zobrazit svalovou a nervovou tkáň a smyslové orgány (nosní dutiny a neuromasty). Pomocí Lugolova roztoku byly u štiky obecné (*Esox lucius*) zobrazeny různé části mozku, svaly, chrupavky žaberních oblouků, vrstvy sítnice, optické nervy a čočky. Jódové roztoky navíc pomáhají zobrazit vzorky fixované v etanolu, proto se hodí pro snímání v něm naložených muzejních exponátů. Jódové kontrastní látky byly úspěšně vyzkoušeny i na mihuli (*Lampetra*), či jeseteru sachalinském (*Acipenser medirostris*), PTA i Lugolův roztok pomohly zobrazit měkké tkáně embryí myši a drápatek rodu *Xenopus*, a dokonce i hmyz a hmyzí kukly. Celkem se hodnotilo 19 vzorků zvířat v jódových kontrastních látkách, PTA nebo OsO_4 při rozlišeních od 1 voxelu = 0,9 μm do 1 voxel = 15 μm (Metscher, 2009b).

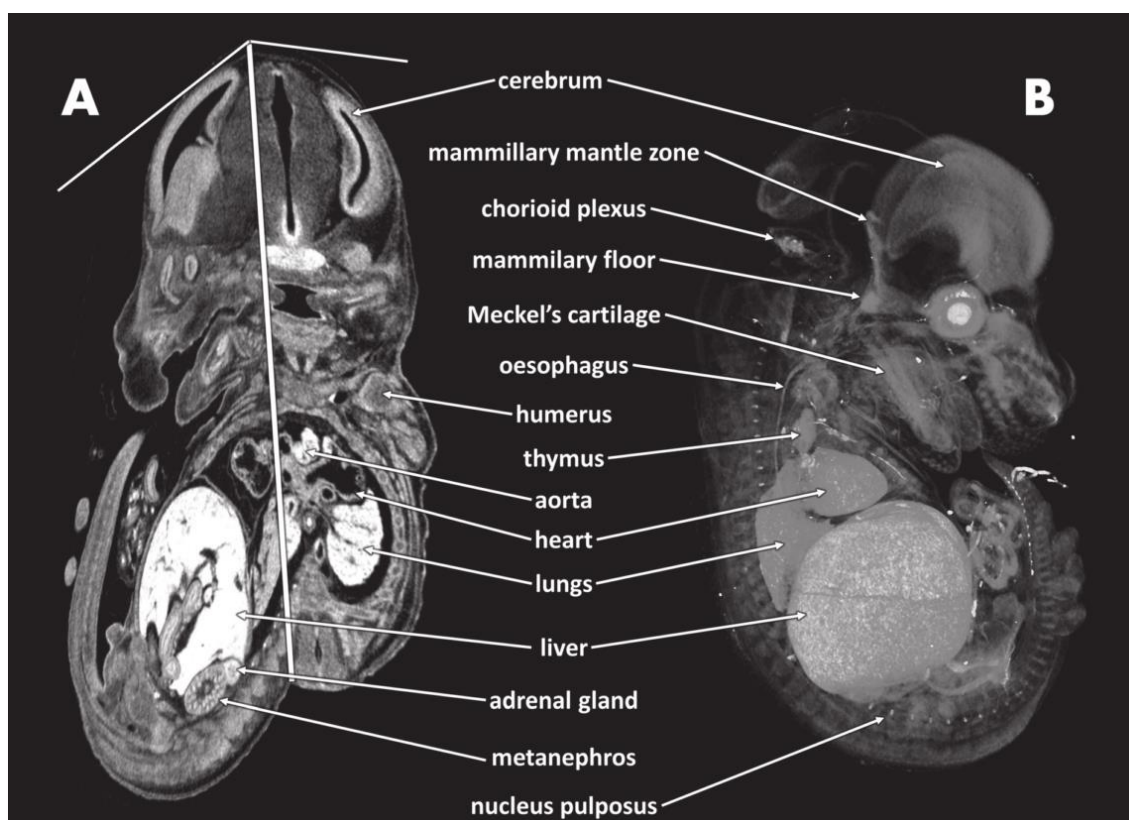


Obr. 10. Mláďe štiky obecné (*E. lucius*) zobrazené pomocí Lugolova roztoku. Nalevo jsou tři prostorové rendery štiky v různých pozicích. Napravo nahoře je prostorový render v řezu. Vpravo dole virtuální řezy získané z trojrozměrného modelu. Na řezech jsou rozeznatelné oční čočky, vrstvy sítnice a oční nervy (převzato z Metscher, 2009b).

V Pauwelsově studii bylo hodnoceno za stejných podmínek 28 potenciálně vhodných kontrastních látek, nejdříve aplikovaných na sušenou slaninu a potom na zadní končetiny myši. Jako kontrastní látka s nejlepšími vlastnostmi z ní vyšel HgCl_2 , který dokázal zobrazit v myši tlapce kromě kostí i svalové snopce, šlachy, vazy kolenního kloubu a velké cévy. Svalové snopce a šlachy byly zobrazeny i pomocí PMA, PTA, Na_2WO_4 a $(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4$. Jako nejsnadněji pronikající kontrastní látky byly vyhodnoceny KI a Na_2WO_4 , které se tak hodí pro snímkování velkých vzorků. Všechny tyto látky také jasně zobrazily svalovou a tukovou tkáň. PMA a PTA byly vyhodnoceny jako příliš pomalu pronikající při snímkování velkých vzorků (Pauwels *et al.*, 2013).

V další studii ovšem byly tyto látky (PMA a PTA) úspěšně použity spolu s OsO_4 k zobrazení myších embryí (*Mus musculus*), pulců drápatky vodní (*Xenopus laevis*) a dánia pruhovaného (*Danio rerio*). Embrya myši a pulci dosahovali velikosti kolem 10

mm, dánío měřilo 22 mm. Myši byly ponořeny do OsO₄ a PTA, jedno myší embryo a dánío do PMA, pulci byly vloženi do PTA. Dosažené prostorové rozlišení se pohybovalo od 3,40 µm do 6,24 µm na voxel. Nejlepší výsledky byly dosaženy s PMA, možná kvůli dlouhé době (6 dní), po kterou byly vzorky látky vystaveny. Dobré výsledky byly dosaženy i s PTA a toxickým OsO₄, (který je tedy nahraditelný netoxickou variantou). Pomocí uvedených kontrastních látek byly nejlépe zobrazeny plíce, játra, krev, mozková tkáň a epitely. Viditelné byly i svaly, srdce, chrupavky a brzlík, PTA a PMA zobrazily i osifikační centra uvnitř chrupavek (Descamps *et al.*, 2014).



Obr. 11. Myší embryo vizualizované pomocí OsO₄ – vlevo složený řez, vpravo prostorový render (převzato z Descamps *et al.*, 2014)

PTA a PMA byly dokonce použity s úspěchem i pro vizualizaci myší a kachní (*Anas platyrhynchos f. domestica*) míchy s migrujícími larvami parazitického helminta *Trichobilharzia regenti*. Vzorky míchy byly ze zvířat vyjmuty 5 dní po infekci, fixovány a ponořeny do kontrastních látek (Lugolův roztok, PTA, PMA a OsO₄). Na snímcích s PTA a PMA s rozlišením 3 µm byly kromě bílé a šedé hmoty patrné i larvy, které migrovaly především bílou hmotou a prostorem mezi míchou a míšním obalem. Pokud by bylo možné s některou kontrastní látkou vizualizovat larvy v mozkové struktuře *in*

vivo, otevřely by se tím nové možnosti ve výzkumu interakce parazita a hostitele využitelné v klinické praxi (Bulantová *et al.*, 2016).

Lugolův roztok (I₂KI) byl použit s úspěchem pro vizualizaci měkkých tkání myších embryí. Vzorky byly skenované se zvětšením 1 voxel = 16 μm anebo 32 μm. Ve snaze minimalizovat smršťování vzorků a artefakty byl použit isotonický roztok. Ten smrštění zmírnil, ale přesto mu nezabránil úplně. Se zvyšující se koncentrací kontrastní látky a delší dobou působení dochází k vyššímu smrštění vzorku, ale i intenzivnějšímu rozdílu v zobrazení odlišných tkání a stejnoměrnějšímu pronikání látky vzorkem. Zvlášť dobře byla zobrazena játra a hnědý tuk, dále byly v embryích pozorovány mezodermální somity, krev, v mozku a míše byla rozeznatelná bílá a šedá hmota. Pozorování různě starých embryí myší umožnilo sledovat vývoj cévního řečiště a srdce, a dokonce vývoj vrozených srdečních vad (Degenhardt *et al.*, 2010).

Velké a postembryonální vzorky

Pro skenování velkých vzorků je potřeba nalézt kontrastní látku, která dokáže celým vzorkem snadno proniknout. Jako vhodné kontrastní látky byly na skenování velkých vzorků vybrány anorganické sloučeniny jódu, které tvoří malé molekuly v porovnání např. s PTA a vzorek penetruje poměrně rychle (Metscher, 2009b).

Vzorek se ovšem v kontrastní látce (a předtím ve fixační) může smrštit a může v něm dojít k artefaktům znehodnocujícím obrazy. Smrštění závisí na velikosti původního vzorku, koncentraci kontrastní látky a délce jejího působení na vzorek. U vypreparovaných částí svalové tkáně a mozečku myší ponořených v kontrastní látce I₂KI nastalo do týdne zmenšení na 50 % u mozečku a na méně než 40 % z původní velikosti u svalové tkáně. Takové výsledky ovšem mohou být ovlivněny i použitím hypertonického roztoku I₂KI, který z tkání vysaje vodu. Menší smršťování může být zajištěno isotonickým roztokem (Degenhardt *et al.*, 2010). Smrštění může být zmírněno i zachováním kostí ve vzorku, které měkké tkáně podrží a nedovolí jim takové změny objemu, i když to může znamenat vznik trhlin ve vzorku (Vickerton *et al.*, 2013).

Vickertonova studie zpochybňuje i výsledky, kterých bylo dosaženo při skenování hlaviček dospělých myší (*M. musculus*), hlavy veverky popelavé (*Sciurus carolinensis*) a svalové tkáně prasete (*Sus scrofa scrofa*) za použití I₂KI jako kontrastní látky. Vzorky byly máčeny v různých koncentracích I₂KI po různou dobu, přičemž nejlepších výsledků

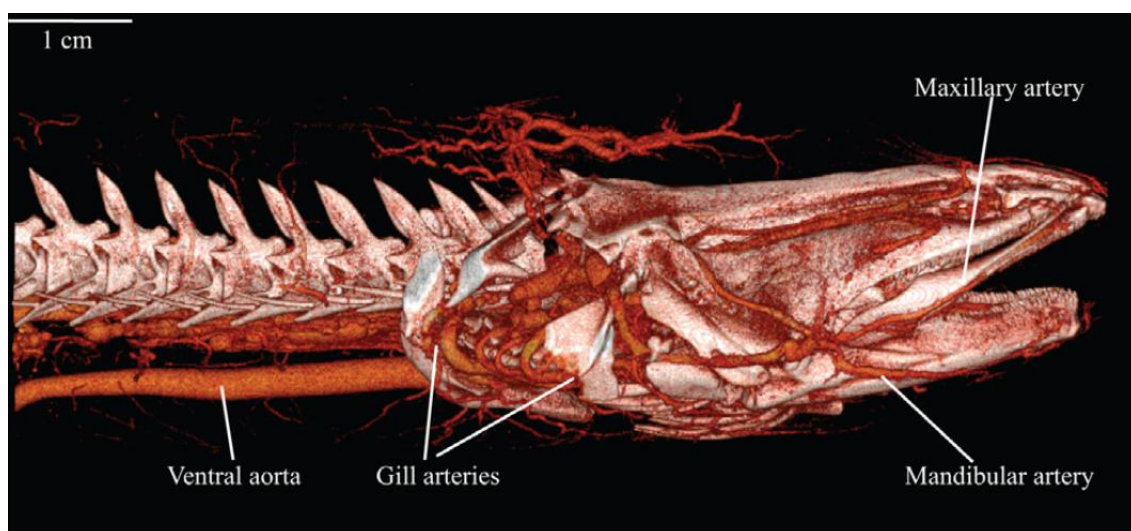
bylo podle autorů dosaženo u vzorků ve vyšších koncentracích a s nejdelší dobou vystavení kontrastní látky (u hlavy veverky dokonce 48 dní). Studie prokázala, že větší vzorek – hlava veverky – potřebuje delší dobu v kontrastní látce, ale i roztok větší koncentrace. Na snímcích byla rozlišena svalová a pojivová tkáň – vazivové obaly svalů na úrovni epimysia (kryje povrch svalu), perimysia (obklopuje svazky svalových vláken) i endomysia (obaluje jednotlivá svalová vlákna), přičemž vazivo se zobrazilo tmavěji, tedy s nižší absorpcí než svaly. Autoři pozorovali samostatné svalové buňky vymezené tmavším vazivem, což ovšem mohou být podle Vickertona i vzduchové trhliny. Velikost veverčí hlavy považuje autor za limitní pro schopnost průniku I₂KI do vzorku a uvádí, že pro větší vzorky bude zapotřebí vstříknout kontrastní látku do krevního řečiště nebo použít tlakovou komoru (Jeffery *et al.*, 2011; Vickerton *et al.*, 2013).

Lugolův roztok I₂KI byl však úspěšně použit i bez těchto doporučení pro vizualizaci tkání hlav aligátorů severoamerických (*Alligator mississippiensis*) a dvoutýdenních emu hnědých (*Dromaius novaehollandiae*), které byly jednoduše ponořeny do roztoku I₂KI. Délky oddělených hlav dosahovaly od 4 – 8 cm u aligátorů a 6 cm u emuů. Skenování dosahovalo rozlišení 30 – 40 μm na 1 voxel. Vzorky byly skenovány několikrát v průběhu 4 týdnů. Optimální zobrazení bylo dosaženo u aligátorů po dvou týdnech a u emuů až po čtyřech, ale výrazné poškození vzorků smrštěním popsané Vickertonem se zde nepotvrdilo. Koncentrace I₂KI může být pro optimální výsledky podle autorů stupňována se zvyšujícím se objemem vzorku. V hlavách emuů a aligátorů byly po obarvení zřetelně patrné svaly, tuková tkáň, exokrinní žlázy, epitely a keratinizované struktury – zobák a peří. U zobrazené nervové tkáně bylo lze rozlišit myelinizovaná a nemyelinizovaná nervová vlákna, ovšem Descamps *et al.*, kteří používali OsO₄ pro zobrazení myších embryí, si myslí, že jde pouze o zobrazená jádra mozkových buněk. Na mozku byly v jejich studii patrné jednotlivé struktury jako např. čichový bulbus, prodloužená mícha, mozeček, mozkové komory. Dále byly znatelné i jednotlivé nervy a svaly, tepny a žilní splav, rohovka, sítnice a nosní sliznice. U aligátorů mikro-CT zobrazilo dokonce pravděpodobně glykolytická bílá a červená oxidativní svalová vlákna (Descamps *et al.*, 2014; Gignac & Kley, 2014).

Kromě ponoření vzorků v roztoku kontrastních látek lze použít i metody intravenózní aplikace, která se používá v lékařství a při níž odpadají problémy s rychlostí penetrace kontrastních látek. Metoda angiografie předběhla pro zobrazení zvířat výše jmenované metody, protože byla pro vizualizaci krevního řečiště použita už v r. 1998. Ledviny 3 krysích samců byly naplněny kontrastní látkou Microfilem a sledovány ve

zvětšeních od 6 do 21 μm . Díky detailnímu zobrazení cév bylo možné v ledvinách odlišit jednotlivé struktury, například kůru a dřeň. Pouze vlasečnice musely být zobrazeny v maximálním zvětšení 6 μm na voxel, jinak splývaly v rozmazaný obraz (Bentley *et al.*, 1998).

Cévní soustavu a prokrvené vnitřní orgány byly zobrazeny v mikroměřítku (rozlišení 64 μm na voxel) také Lauridsenem ve výše zmiňované studii, a to u želvy nádherné (*T. scripta*), aligátora severoamerického (*Alligator mississippiensis*), hrdložábříka bílého (*M. albus*), ropuchy obrovské (*Rhinella marina*), anakondy žluté (*Eunectes notaeus*) a prasete (*Sus scrofa domesticus*). Samostatně byly zobrazeny tepny na srdeční svalovině anakondy žluté a žirafy (*Giraffa camelopardalis*). Cévní soustava hrdložábříka byla napuštěna kontrastní látkou Microfil, pro ostatní zvířata byl použit Mixobar (Lauridsen *et al.*, 2011).



Obr. 12. Trojrozměrná vizualizace cévní soustavy a kostry hrdložábříka bílého (převzato z Lauridsen *et al.*, 2011).

Vizualizace měkkých tkání bez kontrastních látek

Přes všechny úspěchy, které byly dosaženy s kontrastními látkami, nese s sebou jejich použití vždy nevýhody. Například nemusí penetrovat úspěšně celý vzorek nebo je nelze použít pro snímání živých zvířat kvůli toxicitě. Tyto problémy se podařilo odstranit Dudákovi a jeho kolegům, kteří zakomponovali do mikro-CT nový druh detektoru „Timepix Quad detector“ (Dudak *et al.*, 2016). Vylepšování detektorů dnes vůbec výrazně posouvá hranice mikro-CT. Díky velikým „Flat-Panel X-Ray Detector“ lze najednou zobrazit zvíře velikosti králíka. Typ zde použitého „photon-counting“ detektoru (oproti běžně používaným energy-integrating detektorům) nepočítá jen celkovou energii paprsku, který k němu dorazí, ale energii každého fotonu zvlášť (Ritman, 2011). Tento detektor je citlivý na slabé energie rentgenových paprsků a jejich změnu a dokáže odfiltrvat šum přístroje. Je tedy velmi vhodný pro zobrazování měkkých tkání. Přístroj byl navíc upraven tak, aby poskytoval co nejvyšší rozlišení při co nejrychlejším skenování, a tvoří ideální zařízení pro snímání malých živých zvířat. Pomocí vylepšeného CT se podařilo detailně zobrazit hlavu novorozené krajty s kostrou i měkkými tkáněmi. Dosaženo bylo rozlišení 28 μm (Dudak *et al.*, 2015). Výhodou při skenování větších vzorků je možnost nasnímání po částech a propojení do jednoho modelu, čehož lze využít při 2D i 3D skenování. Tuto možnost demonstroval Dudákův tým na rentgenové 2D projekci myší hlavy složené z 12 samostatně nasnímaných polí (Dudak *et al.*, 2016).



Obr. 13. Porovnání fotografie hlavy krajty s vizualizacemi z mikro-CT s Timepix Quad detektorem – první sloupec znázorňuje fotografie a druhé dva sloupce prostorové rendery získané pomocí mikro-CT (převzato z Dudak *et al.*, 2015).

Kromě výhod plynoucích z vývoje nových technologií se lze při zobrazování měkkých tkání spolehnout na přirozenou vlastnost CT, které dobře zobrazuje rozdíl mezi hustším a méně hustým prostředím. Díky tomu lze bez kontrastních látek zobrazit povrch

vzorku nebo dýchací soustavu, jako se to podařilo v Lauridsenově studii u želvy nádherné, aligátora severoamerického a ropuchy obrovské. Povrch těla byl také zobrazen u hrdložábříka bílého s rozlišením 64 μm na voxel (Lauridsen *et al.*, 2011). Ze stejných důvodů se podařilo bez kontrastních látek zobrazit například dýchací soustavu hroznýšovitých hadů a krajt. Zástupci krajty královské (*Python regius*), hroznýše královského (*Boa constrictor*), krajty mřížkované (*Python reticulatus*), krajty zelené (*Morelia viridis*), hroznýšovce duhového (*Epicrates cenchria*) a krajty diamantové (*Morelia spilota*) byly skenovány pomocí CT s tloušťkou řezů 2 mm. Celkem bylo skenováno 39 hadů velikosti od zhruba 1 m do 3,6 m za účelem zobrazit jejich zdravé dýchací cesty. Skenování probíhalo u živých zvířat mezi výdechem a nádechem. Snímky byly vyhodnocovány jako jednotlivé řezy. Byl zobrazen lumen plic a plicní tkáň ohraničené svalovinou a žebry. I když už jednalo o rozlišení nespádající do mikro-CT, byla na snímcích plicní tkáň jasně patrná síť vlásečnic (Pees *et al.*, 2009).

Návrh dalšího výzkumu obratlovců pomocí mikro-CT

Na základě předložené rešerše se domnívám, že mikro-CT je metodou mimořádně výhodnou při ekomorfologickém studiu obratlovců. Vizualizace složitých trojrozměrných struktur a jejich přesné umístění uvnitř těla zvířete může přispět k pochopení funkce a evoluce složitých morfologických struktur. Zároveň možnost měřit s mikro-CT složitě struktury nejen lineárně, ale i objemově, tvoří z této metody skvělý exaktní nástroj pro vyhodnocování morfologických změn a sledování vlivu prostředí na ně. Předkládám další možné využití mikro-CT v rámci ekomorfologického studia obratlovců.

Kosti a zuby

S bezproblémovým zobrazováním mineralizovaných tkání se mikro-CT hodí zejména pro skenování prostorově složitě kostry obratlovců. Ze snímků je možné přesně měřit jednotlivé části lebky a kostí a vyhodnocovat jejich pevnost danou tloušťkou a tvarem, což by mohlo přispět ke studiu životních a potravních strategií. Metoda je vhodná pro ekomorfologické studie zubů v rámci různých skupin obratlovců, přičemž získáme i přesné trojrozměrné modely zubů malých zvířat.

- Na lebce by bylo možné vizualizovat kanály pro hlavové nervy a jejich objem.
- U samic malých savců by se dala přesně změřit šířka pánevního otvoru a mohla by být vyhodnocena ve vztahu k životním strategiím (např. počet mláďat a frekvence vrhů) a porovnána mezidruhově nebo vnitrodruhově při sledování odlišných životních podmínek.
- Bylo by možné získat přesné modely končetin a pletenců u jednotlivých skupin malých obratlovců, např. netopýrů, porovnat jejich tvar a rozměry v závislosti na životním prostředí.
- Mikro-CT by mohlo posloužit při hledání vzniku jedových zubů hadů ve fosilním záznamu na základě sledování jejich tvaru.

Hustota a struktura kostí

Díky možnosti mikro-CT zobrazit trabekulární strukturu kostí by bylo možné zjistit, zda se její struktura mění nejen v závislosti na velikosti zvířete (Doubé *et al.*, 2011), ale například i na životním stylu zvířete a převládajících tlacích v kostech.

- Bylo by možné přesně spočítat poměr kostěné tkáně a kostní dřeně u různých skupin anebo poměr kostěné tkáně, dřeně a pneumatizovaných prostor v kostech ptáků. Tyto informace by mohly být porovnány s mechanickými vlastnostmi kostí a způsobem a místem života zvířete a u ptáků například se schopností letu.
- Kromě vlivu hmotnosti tvora na strukturu trabekulární kosti (Doubé et al. 2011) by mohl být vyhodnocen i vliv vyšších tlaků na její strukturu a hustotu například u obratlovců žijících ve vodě a v hlubině.

Smysly

Podobně jako při výzkumu citlivosti sluchu u ptáků a plazů na základě délky virtuálního odlitku skalní kosti (Walsh *et al.*, 2009) by mohly být u jednotlivých skupin obratlovců provedeny studie zjišťující citlivost čichu a zraku.

- V rámci jednotlivých skupin obratlovců (například hmyzožravců nebo šelem) by bylo možné sledovat vliv délky nosní dutiny na povrch čichového epitelu a množství čichových buněk anebo vliv velikosti oka na množství světločivných buněk. Rozměry nosní dutiny a oka může mikro-CT přesně změřit i u malých obratlovců.
- Při skenování oka s kontrastními látkami prokázalo CT velkou citlivost i k jeho vnitřní stavbě, již by bylo možné na základě přesných prostorových modelů v mikroměřítku u živočichů porovnávat.
- Mikro-CT se mimořádně hodí ke skenování sluchových kůstek, z jejichž přesné velikosti a tvaru by mohl být odvozen vliv na citlivost sluchu živočicha.

Nervová soustava

Díky vizualizaci bílé a šedé hmoty by bylo možné sledovat jejich přesný poměr a pozici v mozku u různých skupin obratlovců.

- Poměr šedé a bílé hmoty by mohl být porovnán například vnitrodruhově u jedinců žijících v zajetí oproti jedincům v přirozeném prostředí.
- Pomocí mikro-CT by vůbec mohly být změřeny a porovnány objemy všech tkání v těle u jednotlivých druhů. Například sledování poměrů tkání v pravé a levé straně organismu by mohlo poodhalit lateralitu jedince.

Rohovité struktury

CT dokázalo jasně vykreslit rohovité šupiny varanovce (Rieppel *et al.*, 2008) nebo krunýř želv (Lauridsen *et al.*, 2011) i hmatové vousy (Descamps *et al.*, 2014). Tyto a jiné rohovité struktury by mohly být pozorovány detailně.

- U krunýřů želv by bylo možné vyhodnotit, zda je jeho tloušťka a pevnost i v konkrétních bodech závislá na daném životním prostředí a zda vývoj krunýře například reaguje na přítomnost nebo nepřítomnost predátorů schopných ohrozit želvu dané velikosti.

Cizorodá tělesa uvnitř zvířat

- Při skenování ptáků by bylo možné zobrazit kameny v jejich volatech a vyhodnotit, zda se jejich počet, velikost a tvar mění podle stravy, kterou se pták živí.

Svaly

- Při vizualizaci svalů pomocí CT by šlo spočítat jejich objem a bylo by možné sledovat, jak moc závisí výkon svalu na jeho objemu.
- Mohla by být porovnána výkonnost konkrétních svalů v závislosti na prostředí, kde zvíře žije, a na způsobu jeho pohybu například u příbuzných skupin hlodavců pohybujících se v kamenitém nebo v rovném terénu.
- Mikro-CT může posloužit k vizualizaci různých fází kousání a stahu čelistních svalů u jednotlivých skupin obratlovců a k objasnění vzniku žvýkání.

Dýchací soustava

Bez použití kontrastních látek je dnes možné naskenovat kromě kostry a povrchu těla tvora také jeho dýchací soustavu (Pees *et al.*, 2009). Díky mikro-CT můžeme přesně vyhodnotit velikost a tvar plic a dýchací soustavy, ale i jejich mikrostrukturu u jednotlivých skupin obratlovců. Naměřené údaje můžeme vztahovat k životním strategiím zvířat a hledat mezi nimi souvislost.

- Mohlo by být například přesně sledováno, nakolik se plíce liší u ptáků létavých a nelétavých.

Závěr

Za nejdůležitější potenciál mikro-CT v ekomorfologickém výzkumu obratlovců považují dokonalé zobrazení malých trojrozměrných struktur a možnost jejich přesného měření. Díky tvorbě 3D vizualizací v mikroměřítku je mikro-CT přesným nástrojem morfologie, s nímž zjistíme nejen lineární rozměry, ale i přesné údaje o objemu struktur (Metscher, 2009b). Přesné výsledky dosažené s mikro-CT můžeme zhodnotit v etologických a ekologických studiích (Kawabe *et al.*, 2009; Walsh *et al.*, 2009).

Dosah ekomorfologických poznatků může v rámci fylogenetických studií doplnit i molekulární metody výzkumu (Metscher, 2009b; Rieppel *et al.*, 2008). Díky využití mikro-CT pro skenování vzácných muzejních vzorků a vyhynulých zvířat lze získat zásadní informace pro srovnávací morfologické a ekomorfologické studie (Jeffery *et al.*, 2011; Metscher, 2009b). Fylogenetické studie by bylo jistě zajímavé porovnávat i s vývojem ontogenetickým (Werneburg *et al.*, 2015). Kvůli radiaci ovšem vytvoření vývojové řady pomocí mikro-CT znamená sehnat a obětovat mnoho vzorků daného zvířete (Boughner *et al.*, 2007). Možnost opakovaného skenování zvířete umožní sledovat v prostoru a v čase například léčbu zvířete anebo nějaký zákrok na pozorované tkáni (Rhodes *et al.*, 1999). Další možnosti mikro-CT tedy budou záležet právě na snižování dávek radiace a na možnosti vizualizace měkkých tkání bez kontrastních látek (Dudak *et al.*, 2015) i u živých zvířat. Kromě vylepšování rozlišení musí tedy mikro-CT čelit i problémům souvisejícím se zvyšující se radiací pro malé vzorky (Ritman, 2007). Není tedy divu, že se pro předávání vzájemných zkušeností s mikro-CT a dalšími metodami práce s malými vzorky vyvinulo ustálené označení „small animal imaging“.

Na základě porozumění současným možnostem mikro-CT jsem se snažila zhodnotit význam této metody při výzkumu obratlovců. Po prostudování dostupné literatury využívající tuto metodu jsem se pokusila navrhnout další možné způsoby využití mikro-CT v kontextu ekomorfologického výzkumu obratlovců. Metoda by mohla být využita například pro studium vlivu života v mořském a hlubokomořském prostředí na strukturu trabekulární kosti nebo pro přesné měření a porovnání tvaru a velikosti plic u létavých a nelétavých ptáků.

Použitá literatura

- Attwood D. 2006.** Microscopy: nanotomography comes of age. *Nature* **442**: 642–643.
- Bentley D, Rodnguez-barbero A, Rltman EL, et al. 1998.** Three-Dimensional Microcomputed Tomography of Renal Vasculature in Rats. *Hypertension* **31**[part 2]: 440–444.
- Bentley MD, Jorgensen SM, Lerman LO, et al. 2007.** Visualization of three-dimensional nephron structure with microcomputed tomography. *Anatomical Record* **290**: 277–283.
- Boughner JC, Buchtová M, Fu K, et al. 2007.** Embryonic development of Python sebae - I: Staging criteria and macroscopic skeletal morphogenesis of the head and limbs. *Zoology* **110**: 212–230.
- Bulantová J, Macháček T, Panská L, et al. 2016.** Trichobilharzia regenti (Schistosomatidae): 3D imaging techniques in characterization of larval migration through the CNS of vertebrates. *Micron* **83**: 62–71.
- Cierniak R. 2011.** X-ray computed tomography in biomedical engineering. *X-Ray Computed Tomography in Biomedical Engineering*: 1–319.
- Cole HA, Yuasa M, Hawley G, et al. 2013.** Differential development of the distal and proximal femoral epiphysis and physis in mice. *Bone* **52**: 337–346.
- Coleman RE, Delbeke D, Guiberteau MJ, et al. 2005.** Concurrent PET / CT with an Integrated Imaging System : Intersociety Dialogue from the Joint Working Group of the American College of Radiology , the Society of Nuclear Medicine , and the Society of Computed Body Tomography and Magnetic Resonance. : 1225–1239.
- Cormack AM. 1980.** Early Two-Dimensional Reconstruction (CT Scanning) and Recent Topics Stemming from It. *Journal of Computed Assisted Tomography* **4**(5): 658 – 664.
- Cosmacini P & Piacentini P. 2008.** Appunti sulla storia dello studio radiografico delle mummie anticoegiziane: Dalla radiografia convenzionale alle più recenti tecniche di immagine. *Radiologia Medica* **113**: 615–626.
- de Crespigny A, Bou-Reslan H, Nishimura MC, et al. 2008.** 3D micro-CT imaging of the postmortem brain. *Journal of Neuroscience Methods* **171**: 207–213.
- Curtis N, Jones MEH, Lappin AK, et al. 2010.** Comparison between in vivo and theoretical bite performance: Using multi-body modelling to predict muscle and bite forces in a reptile skull. *Journal of Biomechanics* **43**: 2804–2809.
- Degenhardt K, Wright AC, Horng D, et al. 2010.** Rapid 3D phenotyping of cardiovascular development in mouse embryos by micro-CT with iodine staining. *Circulation: Cardiovascular Imaging* **3**: 314–322.
- Descamps E, Sochacka A, de Kegel B, et al. 2014.** Soft tissue discrimination with contrast agents using micro-ct scanning. *Belgian Journal of Zoology* **144**: 20–40.
- Dinley J, Hawkins L, Paterson G, et al. 2010.** Micro-computed X-ray tomography: A new non-destructive method of assessing sectional, fly-through and 3D imaging of a soft-bodied marine worm. *Journal of Microscopy* **238**: 123–133.
- Doube M, Klosowski MM, Wiktorowicz-Conroy AM, et al. 2011.** Trabecular bone scales allometrically in mammals and birds. *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society* **278**: 3067–

3073.

Dudak J, Zemlicka J, Krejci F, et al. 2015. X-ray micro-CT scanner for small animal imaging based on Timepix detector technology. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research, Section A: Accelerators, Spectrometers, Detectors and Associated Equipment* **773**: 81–86.

Dudak J, Zemlicka J, Krejci F, et al. 2016. Evaluation of sample holders designed for long-lasting X-ray micro-tomographic scans of ex-vivo soft tissue samples. *Journal of Instrumentation* **11**: C03005–C03005.

Ertl-Wagner B, Eftimov L, Blume J, et al. 2008. Cranial CT with 64-, 16-, 4- and single-slice CT systems-comparison of image quality and posterior fossa artifacts in routine brain imaging with standard protocols. *European Radiology* **18**: 1720–1726.

Fishman EK, Ney DR, Heath DG, et al. 2006. Volume rendering versus maximum intensity projection in CT angiography: what works best, when, and why. *Radiographics : a review publication of the Radiological Society of North America, Inc* **26**: 905–922.

Fleischmann D & Boas FE. 2011. Computed tomography-old ideas and new technology. *European Radiology* **21**: 510–517.

Gignac PM & Kley NJ. 2014. Iodine-enhanced micro-CT imaging: Methodological refinements for the study of the soft-tissue anatomy of post-embryonic vertebrates. *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution* **322**: 166–176.

Holdsworth DW & Thornton MM. 2002. Micro-CT in small animal and specimen imaging. *Trends in Biotechnology* **20**: 34–39.

Hounsfield GN. 1973. Computerized transverse axial scanning (tomography): Part I. Description of system. *British Journal of Radiology* **46**: 1016 – 1022.

Hounsfield GN. 1976. Picture quality of computed tomography. *AJR. American journal of roentgenology* **127**: 3–9.

Hounsfield GN. 1978. Potential uses of more accurate CT absorption values by filtering. *American Journal of Roentgenology* **131**: 103–106.

Jeffery NS, Stephenson RS, Gallagher JA, et al. 2011. Micro-computed tomography with iodine staining resolves the arrangement of muscle fibres. *Journal of Biomechanics* **44**: 189–192.

Johnson JT, Hansen MS, Wu I, et al. 2006. Virtual histology of transgenic mouse embryos for high-throughput phenotyping. *PLoS Genetics* **2**: 471–477.

Jones MEH, Werneburg I, Curtis N, et al. 2012. The Head and Neck Anatomy of Sea Turtles (Cryptodira: Chelonioidae) and Skull Shape in Testudines. *PLoS ONE* **7**: 352–354.

Kawabe S, Shimokawa T, Miki H, et al. 2009. A Simple and Accurate Method for Estimating the Brain Volume of Birds: Possible Application in Paleoneurology. *Brain, Behavior and Evolution* **74**: 295–301.

de Kemp RA, Epstein FH, Catana C, et al. 2010. Small-Animal Molecular Imaging Methods. *Journal of Nuclear Medicine* **51**: 18S–32S.

Lauridsen H, Hansen K, Wang T, et al. 2011. Inside out: Modern imaging techniques to reveal animal anatomy. *PLoS ONE* **6**: 1–10.

Losos JB. 1990. Ecomorphology, performance capability, and scaling of west indian *Anolis* lizards: an

- evolutionary analysis. *Ecological monographs* **60**(3): 369 – 388.
- Metscher BD. 2009a.** MicroCT for developmental biology: A versatile tool for high-contrast 3D imaging at histological resolutions. *Developmental Dynamics* **238**: 632–640.
- Metscher BD. 2009b.** MicroCT for comparative morphology: simple staining methods allow high-contrast 3D imaging of diverse non-mineralized animal tissues. *BMC Physiology* **9**: 11.
- Mizutani R & Suzuki Y. 2012.** X-ray microtomography in biology. *Micron* **43**: 104–115.
- Pauwels E, Van Loo D, Cornillie P, et al. 2013.** An exploratory study of contrast agents for soft tissue visualization by means of high resolution X-ray computed tomography imaging. *Journal of Microscopy* **250**: 21–31.
- Pees M, Kiefer I, Thielebein J, et al. 2009.** Computed tomography of the lung of healthy snakes of the species python regius, boa constrictor, python reticulatus, morelia viridis, epicrates cenchria, and morelia spilota. *Veterinary Radiology and Ultrasound* **50**: 487–491.
- Pyron RA, Burbrink FT & Wiens JJ. 2013.** A phylogeny and revised classification of Squamata, including 4161 species of lizards and snakes. *BMC Evolutionary Biology* **13**: 93.
- Rayfield EJ, Norman DB, Horner CC, et al. 2001.** Cranial design and function in a large theropod dinosaur. *Nature* **409**: 1033–1037.
- Reichl J & Vřetička M.** Encyklopedie fyziky [online]. [cit. 2016-08-16]. Available at: <http://fyzika.jreichl.com/>.
- Rhodes JS, Ford TR, Lynch J a, et al. 1999.** Micro-computed tomography: a new tool for experimental endodontology. *International endodontic journal* **32**: 165–70.
- Rieppel O, Gauthier J & Maisano J. 2008.** Comparative morphology of the dermal palate in squamate reptiles, with comments on phylogenetic implications. *Zoological Journal of the Linnean Society* **152**: 131–152.
- Ritman EL. 2004.** Micro-Computed Tomography—Current Status and Developments. *Annual Review of Biomedical Engineering* **6**: 185–208.
- Ritman EL. 2007.** Small-animal CT: Its difference from, and impact on, clinical CT. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research, Section A: Accelerators, Spectrometers, Detectors and Associated Equipment* **580**: 968–970.
- Ritman EL. 2011.** Current Status of Developments and Applications of Micro-CT. *Annual Review of Biomedical Engineering* **13**: 531–552.
- Schambach SJ, Bag S, Schilling L, et al. 2010.** Application of micro-CT in small animal imaging. *Methods* **50**: 2–13.
- Vickerton P, Jarvis J & Jeffery N. 2013.** Concentration-dependent specimen shrinkage in iodine-enhanced microCT. *Journal of Anatomy* **223**: 185–193.
- Walsh S a, Barrett PM, Milner AC, et al. 2009.** Inner ear anatomy is a proxy for deducing auditory capability and behaviour in reptiles and birds. *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society* **276**: 1355–1360.
- Werneburg I, Polachowski KM & Hutchinson MN. 2015.** Bony skull development in the Argus monitor (Squamata, Varanidae, Varanus panoptes) with comments on developmental timing and adult anatomy. *Zoology* **118**: 255–280.